

# ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EQUINER MESENCHYMALER STAMMZELLEN FÜR EINEN MÖGLICHEN EINSATZ IM TISSUE ENGINEERING

IRIS GOLETZ

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG





**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinäranatomie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität

**und**

Aus dem Institut I für Anatomie  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Universität zu Köln

Betreuer: Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

**Isolierung und Charakterisierung  
equiner mesenchymaler Stammzellen für einen  
möglichen Einsatz im Tissue Engineering**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Iris Goletz**

Tierärztin aus Aachen

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G: Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. S. Arnhold  
Prof. Dr. L.-F. Litzke

Tag der Disputation: 13.01.2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Einleitung und Stand der Forschung.....	1
1.2. Osteoarthritiden (degenerative Gelenkerkrankungen).....	2
1.3. Vorkommen und Häufigkeit von Verletzungen der Band- und Sehnenstrukturen .....	6
1.4. Knochenläsion unterschiedlicher Genese.....	8
1.5. Stammzellen und deren therapeutische Einsatzmöglichkeiten .....	9
<b>2. MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>14</b>
2.1. Liste der verwendeten Materialien.....	14
2.2. Geräte der Zellkultur.....	16
2.3. Gewinnung eMSC aus dem Sternumaspirat von Pferden.....	16
2.4. Aufbereitung von equinem Knochenmark.....	17
2.5. Durchführung des Medienwechsels .....	18
2.6. Der Vorgang des Passagierens .....	19
2.7. Kryokonservierung mit Protektion der Zellen.....	19
2.8. Auftauen der kryokonservierten Zellen .....	20
2.9. Colony Forming Units Fibroblast (CFU-F) .....	21
2.10. Nachweis der Zellmigration (wounded healing assay).....	21
2.11. Untersuchung der Zellproliferation.....	22
2.12. Untersuchung der Zellvitalität der eMSC bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.....	24
2.13. Untersuchung auf Pluripotenz der eMSC.....	24
2.13.1. Adipozyten- und Osteozytendifferenzierung.....	25
2.13.2. Chondrozytendifferenzierung.....	26
2.14. Kultivierung der eMSC unter Sauerstoffreduktion.....	26

<b>2.15. Zellaufbereitung für die histologische Untersuchung.....</b>	<b>27</b>
2.15.1. Fixierung mittels Paraformaldehyd.....	27
2.15.2. Fixierung mittels Methanol / Aceton für die Van Kossa-Färbung.....	28
2.15.3. Fixierung mittels Glutaraldehyd / Pikrinsäure .....	28
<b>2.16. Histologische Nachweisverfahren .....</b>	<b>29</b>
2.16.1. Red Oil Färbung zum Nachweis der adipogenen Differenzierung Hämatoxilin Gegenfärbung nach Mayer.....	29
2.16.2. NBT/BCIP Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung (ALP Färbung) zum Knochennachweis.....	29
2.16.3. Van-Kossa-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung, zum morphologischen Kalknachweis (BTT) .....	30
2.16.4. Metachromatische Toluidinblau Färbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung .....	31
2.16.5. Alzianblaufärbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung.....	31
<b>2.17. Immunhistochemie .....</b>	<b>32</b>
2.17.1. Prinzip der Immunhistochemie.....	32
2.17.2. Verwendete primäre Antikörper .....	35
2.17.3. Verwendete sekundäre Antikörper .....	35
<b>2.18. BrDU- Markierung .....</b>	<b>35</b>
2.18.1. BrDU-Labeling in-vitro.....	36
<b>2.19. Transfektion der Zellen mittels eines adenoviralen Vektors .....</b>	<b>37</b>
<b>2.20. Austestung von verschiedenen Trägermaterialien .....</b>	<b>37</b>
2.20.1. Kollagen I Matrix als dreidimensionales Gel.....	37
2.20.2. Kultivierung auf Microcarriern .....	38
2.20.3. Kultivierung der eMSC auf Microcarriern in einer Rotationskultur im osteogenen Medium .....	39
2.20.4. Fibrinbeads als Trägermaterial .....	40
<b>2.21. Einbetten für die Histologie, sowie für Semi- und Ultradünnschnitte .....</b>	<b>42</b>
2.21.1. Paraffineinbettung für das Autotechnicon für Stücke bis zur Dicke von 4 mm .....	42
2.21.2. Einbetten für Semi- und Ultradünnschnitte.....	43
<b>2.22. Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....</b>	<b>44</b>
2.22.1. RNA Isolierung .....	44
2.22.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	45
2.22.3. DNase Verdau.....	45
2.22.4. Reverse Transkription (RT) .....	46
2.22.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) / RT-PCR.....	46
2.22.6. Elektrophoretische Auftrennung.....	48
<b>2.23. Mikroskopie .....</b>	<b>49</b>
2.23.1. Lichtmikroskopie.....	49
2.23.2. Fluoreszenzmikroskopie .....	50
2.23.3. Elektronenmikroskopie.....	50
<b>2.24. Reimplantation der Zellen.....</b>	<b>50</b>

<b>2.25. Bestimmung der Zellzahl und Generationsverdopplungszeit .....</b>	<b>51</b>
2.25.1. Zellzählung der kultivierten Zellen .....	51
2.25.2. Berechnung der Generationsverdopplung .....	52
2.25.3. Statistische Kalkulation des Signifikanzniveaus .....	52
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
3.1. Kultivierung equiner mesenchymaler Stammzellen .....	53
3.2. Colony forming units-fibroblast assay (CFU) .....	55
3.3. Demonstrations des Teilungspotentials der Zellen mittels Ki 67 .....	57
3.4. Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff .....	58
3.5. Untersuchung zur Vitalität der eMSC bei Lagerung auf Eis und bei +4° C ..	59
3.6. Untersuchung des Einflusses einer hypoxischen Stoffwechsellaage auf das Proliferationsverhalten der eMSC's .....	61
3.7. Untersuchung zur Proliferationsaktivität und zur Zellemorphologie in unterschiedlichen Seren und Medien .....	64
3.8. Untersuchung der Zellmigration (wounded healing assay) nach Anfertigung eines Scratches .....	74
3.9. Charakterisierung der eMSC mittels einer immunhistochemischen Färbung .....	78
3.9.1. CD 90 / THY 1 .....	78
3.9.2. Perlecan und Fibronectin .....	79
3.9.3. Expression von $\beta 1$ Integrin .....	80
3.10. Untersuchung zur Pluripotenz der eMSC's anhand des adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungspotentials .....	81
3.10.1. Adipogenes Differenzierungspotential .....	81
3.10.2. Osteogenes Differenzierungspotential .....	82
3.10.3. Chondrogenes Differenzierungspotential .....	85
3.11. Vektortransduktion eines adenoviralen Vektors .....	89
3.12. Kultivierung auf Trägermaterialien .....	93
3.12.1. Kollagen-Gel .....	93
3.12.2. Microcarrier aus Kollagenmatrix .....	94
3.12.3. Kultivierung der eMSC auf Microcarriern in einer Rotationskultur .....	96
3.12.4. Kultivierung der eMSC auf einer Fibrinmatrix .....	97
3.13. Klinisch-therapeutischer Einsatz der eMSC .....	102
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>104</b>
4.1. Zielsetzung .....	104
4.2. Kritik der Methode .....	106

<b>4.3. Diskussion der Befunde .....</b>	<b>113</b>
4.3.1. Isolierung und Kultivierung der equinen mesenchymalen Stammzelle .....	113
4.3.2. Colony forming unit assay .....	114
4.3.3. Beurteilung des Proliferationsverhaltens der Zellen mittels Ki 67 .....	115
4.3.4. Krykonservierung mit anschließender Kultivierung .....	115
4.3.5. Untersuchung zur Vitalität bei verschiedenen Lagerungsbedingungen .....	115
4.3.6. Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Proliferation .....	116
4.3.7. Zellmigration (wounded healing assay) .....	117
4.3.8. Allgemeine Charakterisierung der equinen mesenchymalen Stammzelle .....	118
4.3.9. Untersuchung der Pluripotenz .....	119
4.3.10. Transduktion der eMSC mit einem adenoviralen Vektor .....	121
4.3.11. Einsatz verschiedener Trägermaterialien .....	122
4.3.12. Klinisch- therapeutischer Einsatz der eMSC .....	125
<b>4.4. Ausblick .....</b>	<b>128</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>129</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>132</b>
<b>7. REFERENZ-LISTE.....</b>	<b>135</b>

"Die Schreibweise der vorliegenden Arbeit folgt dem Duden in der 19., neu bearbeiteten und erweiterten Auflage von 1986ff., wobei Eigenarten der naturwissenschaftlichen Diktion unberührt blieben."



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 : Schema der Differenzierungsmöglichkeiten der adulten mesenchymalen Stammzelle .....	11
Abb. 2 : Differenzierungsschema von adulten Knochenmarkstammzellen .....	13
Abb. 3 : Knochenmark des Pferdes      Abb. 4 : Knochenmark auf Eis .....	17
Abb. 5 : Schemazeichnung Adipozyten- und Osteozytendifferenzierung: .....	25
Abb. 6 : Rotationskultur .....	40
Abb. 7 : Proliferationsverhalten in den Passagen 1 und 14 (n=5) .....	54
Abb. 8 : eMSC nach Isolation im Kultivierungsmedium 1 im zeitlichen Verlauf; .....	55
Abb. 9 : CFU-Assay: Koloniewachstum nach 14 tägiger Kultivierung (n = 3) .....	56
Abb. 10 : CFU-F Assay (n = 3) .....	56
Abb. 11 : Visualisierung des Zellteilungspotentials mittels Ki 67 .....	57
Abb. 12 : Kryokonservierte und nicht-konservierte Zellen .....	58
Abb. 13 : Darstellung der Überlebenszeit der eMSC bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen (n = 6) .....	59
Abb. 14 : Generationsverdoppelung unter Sauerstoffreduktion (n = 5) .....	62
Abb. 15 : BrDU-Labeling; Kultivierung unter Standardbedingungen und unter Sauerstoffreduktion .....	63
Abb. 16 : BrDU-Markierung, .....	64
Abb. 17 : Übersicht über die zu erzielenden Passagenzahlen unter Verwendung der verschiedenen getesteten Seren (n = 3). .....	69
Abb. 18 : Morphologie der Zellen unter Darstellung der Fettvakuolen in $\alpha$ MEM (n = 3) .....	70
Abb. 19 : Morphologie der Zellen unter Darstellung der Fettvakuolen in DMEM (n = 3) .....	71
Abb. 20 : Proliferation in Passage 1 in $\alpha$ MEM (oben) und DMEM (unten) (n = 3) .....	72
Abb. 21 : Proliferation in Passage 5 in $\alpha$ MEM (oben) und in DMEM (unten) (n = 3) .....	73
Abb. 22 : Serumtestung (n = 3) .....	74
Abb. 23 : Untersuchung der Zellmigration (wounded healing assay) .....	76
Abb. 24 : Untersuchung der Zellmigration .....	77
Abb. 25 : Scratch Phalloidin gefärbt .....	78
Abb. 26 : IHC Auswertung CD 90 .....	79
Abb. 27 : Immunhistochemische Färbungen; Fibronektin positive eMSC .....	80
Abb. 28 : Immunhistochemische Färbung $\beta$ 1 Integrin positiver eMSC .....	81

Abb. 29 : Adipogene Differenzierung .....	82
Abb. 30 : Vakuolen in Fettdifferenzierung (n = 10) .....	82
Abb. 31 : Osteogene Differenzierung, Van-Kossa-Färbung .....	83
Abb. 32 : Osteogene Differenzierung, NBT-Färbung .....	83
Abb. 33 : Densitometrische Bestimmung der osteogenen Differenzierung im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen (n = 10) .....	84
Abb. 34 : hondrogene Differenzierung mittels Toudinblaufärbung Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme einer densitometrischen Messung .....	86
Abb. 35 : Chondrogene Differenzierung mittels Alzianblau- und Toluidinblaufärbung .....	87
Abb. 36 : Visualisierung einer RT-PCR auf einem Aggarosegel; .....	89
Abb. 37 : Vektortransduktion mittels eines adenoviralen Vektors (n = 6) .....	91
Abb. 38 : GFP – Markierung (n = 6) .....	92
Abb. 39 : Zellen im Kollagen Gel nach 2 Tagen .....	94
Abb. 40 : Zellen auf Microcarriern im Semidünnschnitt .....	95
Abb. 41 : Zellen in einem Microcarrier; Elektronenmikroskopie eines Ultradünnschnittes .....	96
Abb. 42 : Rotationskultur mit eMSC auf Microcarriern in der osteogenen Differenzierung .....	97
Abb. 43 : Fibrinbead in der Vitalbeobachtung .....	98
Abb. 44 : Semidünnschnitt eines Fibrinbeads der mit Zellen besiedelt ist .....	99
Abb. 45 : Elektronenmikrsokopie von eMSC in Fibrinbeads .....	101
Abb. 46 : Ultrasonographische Darstellung eines Fesselträgeransatzes (FTA) vor und nach Stammzellinjektion .....	103

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Einteilung der degenerativen Gelenkerkrankungen des Pferdes .....	3
Tabelle 2 : Liste der verwendeten Materialien .....	15
Tabelle 3 : Verwendete Seren zur Zellproliferation in $\alpha$ MEM und DMEM .....	23
Tabelle 4 : Primäre Antikörper der Immunhistochemie .....	35
Tabelle 5 : Sekundäre Antikörper der Immunhistochemie .....	35
Tabelle 6 : Polymerase-Kettenreaktion, Primer .....	47
Tabelle 7 : Primersequenzen .....	48
Tabelle 8 : Übersicht der verwendeten Seren (n = 3) .....	69

# 1. Einleitung

## 1.1. Einleitung und Stand der Forschung

Erkrankungen des muskuloskeletalen Systems bei Renn-, Reit- und Arbeitspferden sind die wichtigsten Gründe für ein frühzeitiges Außer-Dienst-Stellen bzw. die Hauptursache für einen Trainingsausfall, der sich über Tage bis Wochen erstrecken und Ursache für die Euthanasie dieser Tiere sein kann (Cogger et al. 2006; Rossdale et al. 1985; Philipsson 1998; Wallin 2000). Dies trifft nicht nur für ältere Pferde, sondern auch gerade für jüngere Pferde zu, die am Anfang ihrer Karriere als Sport- oder Hobbypferde stehen. Bei den Erkrankungen des Bewegungsapparates stehen in erster Linie Sehnenverletzungen, Osteoarthritis aber auch Frakturen als Ursache von Lahmheiten bei Freizeit- und Sportpferden im Vordergrund (Silver et al. 1983; Marr et al. 1993).

Die durch solche Schädigungen verursachten lahmheitsbedingten Erkrankungen stellen mit 51,2% den Hauptanteil im Spektrum der Überweisungsursachen dar (Litzke 2006).

Viele dieser Verletzungen sind entweder akute traumatische oder chronisch biomechanisch induzierte Verletzungen, die plötzlich instabil werden und dann zu akuten klinischen Symptomen führen können. Sie sind die Folge des biomechanischen Stresses, der durch eine abnorme Intensität, Dauer oder Frequenz der Belastung auf Knochen, Gelenken und Bändern während des Wettkampfes oder beim Training auftritt. Dabei sind die Zielstrukturen des biomechanischen Insults der hyaline Gelenkknorpel, die Knochen sowie Bänder und Sehnen. Es ist das Resultat einer Imbalance zwischen repetitiven Mikrotraumen, die fortwährend in der Trainingsphase oder im Turnier gesetzt werden.

Dabei zeigt von diesen zuvor genannten Geweben ausschließlich das Knochengewebe nach ausreichender Ruhezeit eine regenerative Kapazität durch regelmäßige Umbauvorgänge. Demgegenüber hat der hyaline Gelenkknorpel keine intrinsische Heilungstendenz. Geschädigte Kollagenfasern der Bänder und Gelenke können durch Fasern regenerieren, die vom Granulationsgewebe her in das läsionierte Areal einwandern. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Erneuerung von

verletzten Sehnen oder Bändern nicht vorhersehbar, es handelt sich aber in der Regel um einen eher lange andauernden Prozeß (Pool and Meagher 1990b).

Der Verlauf dieser Gliedmaßenverletzungen weist ein Schema der biomechanischen Belastungen des Skelettsystems während des Trainings auf, das sich in der Nutzungsform, für die das Pferd gezüchtet worden ist, widerspiegelt.

Eine Ruhepause oder eine Herabsetzung der Trainingsintensität erlauben die Heilung von vielen asymptomatischen und evtl. einigen symptomatischen Verletzungen des knöchernen Gewebes.

## **1.2. Osteoarthritiden (degenerative Gelenkerkrankungen)**

Degenerative Gelenkerkrankungen oder Osteoarthritiden (OA) können als Gruppe von Erkrankungen angesehen werden, bei denen als Endstadium eine progressive Degeneration des Gelenkknorpels sichtbar wird. Aufgrund dieser allgemeinen Gelenkknorpeldegeneration sind weiterhin Veränderungen am Knochen, sowie am das Gelenk umgebende Weichteilgewebe involviert.

Es handelt sich hierbei um chronische Erkrankungen der Gelenke, die durch die Abnutzung der Knorpelschicht an den Gelenken, durch Gelenksinfektionen oder als Folge von Überlastungen durch eine Gelenkerkrankung (Knochenzysten, Osteochondrosis dissecans, Frakturen) gekennzeichnet sind.

Man kann Osteoarthritiden in primäre und sekundäre Formen einteilen (Freeman 1975). Bei den primären Gelenkerkrankungen handelt es sich um idiopathische, altersbedingte Erkrankungen der synovialen Gelenke, die plötzlich ohne ersichtliche Ursache auftreten. Sekundäre Arthritiden entwickeln sich nach traumatischen Verletzungen, bei denen extreme Kräfte auf die Gelenke einwirken. Zu dieser Form gehören auch Entzündungen oder Arthritiden, die durch den falschen Einsatz von Kortikosteroiden verursacht werden. Es handelt sich bei der sekundären Form also um eine Osteoarthritis bekannter Genese (Jaffe 1972).

Allerdings sind die morphologischen Veränderungen bei beiden Formen der Osteoarthritiden ähnlich (Nyack et al. 1981).

Eine Aufteilung der degenerativen Gelenkerkrankungen lässt sich in fünf Formen darstellen:

<b>Typ 1</b>	akute Erkrankungen, verbunden mit Synovialitiden, in Gelenken mit großer Beweglichkeit vorkommend
<b>Typ 2</b>	schleichende Erkrankung, in Gelenken mit geringer Beweglichkeit vorkommend
<b>Typ 3</b>	zufällige oder „nichtprogressive“ Gelenkknorpelerosionen
<b>Typ 4</b>	sekundär nach anderen Erkrankungen, zu denen gehören: <ul style="list-style-type: none"> <li>a) intraartikuläre Frakturen</li> <li>b) Dislokationen (Bänderrisse)</li> <li>c) Wunden</li> <li>d) septische Arthritiden</li> <li>e) Osteochondrosis</li> </ul>
<b>Typ 5</b>	Chondromalazie

**Tabelle 1 : Einteilung der degenerativen Gelenkerkrankungen des Pferdes**

(McIlwraith 1982; McIlwraith and Vachon 1988)

Bei einer Erkrankung nach **Typ 1** stehen als Patientengruppe junge Pferde im Vordergrund. Typ-1-Läsionen werden durch hohe Belastungen der Gelenke, wie sie z.B. bei einem Rennpferd der Fall sind, hervorgerufen. Das Karpal- und das Fesselgelenk sind davon besonders betroffen. Zu den akuten Gelenkerkrankungen zählen hier die Synovialitis und die Kapsulitis, die dem degenerativen Geschehen vorangehen.

Eine **Typ-2**-Erkrankung findet man sowohl bei älteren wie auch bei jüngeren Pferden. Die typischen Erkrankungen hierfür sind z.B. die Krongelenksschale und Knochenspat.

Nichtprogressive Gelenkknorpelerosionen des **Typs 3** werden hauptsächlich als pathologischer Zufallsbefund in der Sektion ermittelt.

Eine **Typ-4**-Erkrankung tritt nach einer Vorschädigung des Gelenkes als sekundärer Schaden auf. Vorangegangene Erkrankungen können eine intraartikuläre Fraktur, Osteochondrosis sowie infektiöse Arthritiden sein.

**Typ 5** beschreibt eine Osteomalazie der Patella.

Bei OA sind Gelenkkapsel, Gelenkknorpel, subchondraler Knochen, Bandapparat und Muskulatur verändert. Anfänglich ist mikroskopisch nur eine Auffaserung der oberflächlichen Knorpelschicht zu sehen (Clyne 1987).

Die Knorpeloberflächen sind aufgeraut, da sich die parallel zur Knorpeloberfläche angeordneten Kollagenfibrillen separieren. Damit geht die Festigkeit und Integrität der tieferen Schichten verloren, so daß der Knorpel in der Tiefe abnormalem Streiß ausgesetzt wird und Fissuren entstehen, die bis in den subchondralen Knochen reichen können (Buschmann et al. 2000). Im zellulären Bereich werden die Chondrozyten im degenerativ veränderten Gelenk zu Beginn größer und bilden Cluster. Cluster bestehen aus nicht funktionsfähigen Chondrozyten.

Sie entwickeln sich insbesondere an den Rändern der Fissuren, weil sich hier durch die Verkürzung der Diffusionsstrecke die Ernährungsverhältnisse verbessert haben (Fassbender 1983). Belastete Knorpelschichten flachen ab, während unbelastete hypertrophieren. Durch Architekturveränderung des Knorpels werden Knorpelfragmente frei. Ihnen folgt letztlich ein kompletter Knorpelverlust unter Einbezug des subchondralen Knochens (Moskowitz and Goldberg 1987).

Die freien Knorpelfragmente werden von Synovialmakrophagen (Typ A) phagozytiert, die Zytokine und Prostaglandine freisetzen (Boniface et al. 1988). Letztere führen zu einer Entzündung der Synovialis. Die Folge sind vermehrte Zottenbildung, Fibrose der Subsynovialis, Zerstörung der Synovialbeschaffenheit und Steigerung des Knorpelabbaus (Hewicker-Trautwein et al. 1999). Häufig betroffen sind Gelenke mit geringer Beweglichkeit und hoher Gewichtslast wie die Art. intertarsale dist., Art. tarsometatarsale, Art. interphalangeus.

Die Diagnose erfolgt durch eine Lahmheitsuntersuchung mit Leitungsanästhesie und Röntgenbildern. Lahmheiten können trotz intraartikulärer Anästhesie fortbestehen, wenn schon subchondraler Knochen und periartikuläre Strukturen angegriffen sind.

Röntgenologisch ist normalerweise eine Verkleinerung des Gelenkspaltes zu sehen, allerdings kann durch Auflösung subchondralen Knochengewebes eine Erweiterung des Spaltes vorgetäuscht werden. Der Bedarf an effektiven Behandlungsmöglichkeiten für Osteoarthritis ist kontinuierlich steigend, aufgrund der steten Zunahme der behandlungsbedürftigen Patienten mit Erkrankungen des Bewegungsapparates (Hegewald et al. 2004b).

Die Behandlungsmöglichkeiten für OA beim Pferd sind vielfältig und immer abhängig von der Ursache und vom Schweregrad der Erkrankung.



Zu den Therapieoptionen gehören: Boxenruhe (zur Ruhigstellung der betroffenen Strukturen) und Physiotherapie (des umgebenden Weichteilgewebes) (RAKER 1962), regelmäßige Hufpflege und Korrektur, ggf. Spezialisen (z.B. Abrollhilfen bei Spat), um Fehlbelastungen der betroffenen Gelenke zu vermeiden (Beseitigung der gelenkschädigenden Primärursache). Langzeitschmerztherapie mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID). In schweren Fällen kann eine intraartikuläre Behandlung mit Steroiden angezeigt sein (Short and Beadle 1978; Webbon and Williams 2002).

Hyaluronsäure oder Glykosaminoglycane können prophylaktisch oder zur Vermeidung einer fortschreitenden Degeneration eingesetzt werden (Yovich et al. 1987; Dyson 2004).

Darüber hinaus gibt es aber auch chirurgische Optionen zur Therapie der Osteoarthritis. Dazu gehören die oberflächliche Abtragung (Küretage) des läsierten Gelenkknorpels (arthroscopic abrasion arthroplasty), um eine intrinsische Heilung zu stimulieren (Johnson 1986), was in der einschlägigen Literatur allerdings sehr kontrovers diskutiert wird (Vachon et al. 1986; Mitchell and Shepard 1976).

Zusätzlich gibt es noch die Möglichkeit von intraartikulären perichondralen oder periostalen Transplantationen, wodurch die Produktion von Knorpelgewebe angeregt werden kann. Das dafür benötigte Ausgangsmaterial kann autolog (Howard et al. 1994) oder allogot gewonnen werden (Garrett 1986).

Schließlich gibt es im Rahmen des „tissue engineering“ noch verschiedene Ansätze zur Behandlung von Knorpelläsionen durch die direkte Injektion von autolog gewonnenen Knorpelzellen (Barnewitz et al. 2003; Litzke et al. 2004). Dabei konnte in Biopsien der entsprechenden Gelenke, zwei Jahre nach intraartikulärer Zellinjektion, eine Zellintegration sowie die Bildung von hyalinem Knorpel in der Region der Chondrozytentransplantate gezeigt werden.

Die Notwendigkeit, die Chondrozyten in einer Monolayerkultur zu expandieren, kann die Dedifferenzierung der Chondrozyten zu Fibroblasten induzieren, was nur durch aufwendige, arbeitsintensive Zellkulturtechnik verhindert werden kann (Benya and Shaffer 1982). Dieser Umstand, sowie die limitierte Verfügbarkeit von autologen Chondrozyten, hat in den letzten Jahren die mesenchymale Stammzelle aus dem Knochenmarkstroma zunehmend in den Fokus des Interesses bei der Behandlung von Erkrankungen des Bewegungsapparates gerückt (Hegewald et al. 2004b).

### 1.3. Vorkommen und Häufigkeit von Verletzungen der Band- und Sehnenstrukturen

Band- und Sehnenverletzungen stellen mit 28% einen relativ hohen Prozentsatz der Ursachen von Lahmheiten bei Rennpferden (Peloso et al. 1994). Sie treten häufiger an den Vorderextremitäten als an den Hinterextremitäten auf, da durch den in der Mitte des Thorax gelegenen Schwerpunkt die Vordergliedmaße mit ca. 60% und die Hintergliedmaße mit 40% des Körpergewichtes belastet wird (Stashak 1989).

Besonders in der Bewegung entsteht, hauptsächlich bei Spring- und Rennpferden, an den Vordergliedmaßen eine extreme physikalische Belastung der Beugestrukturen, wobei diese siebenmal häufiger als die Hintergliedmaßen erkranken (Webbon 1977).

Es werden verschiedenen Nutzungsgruppen typische Schadensbilder zugewiesen, so findet man Läsionen bei Zugpferden zu 75% in der tiefen Beugesehne (TBS), da sie die TBS und ihr Unterstützungsband besonders in der zweiten Hälfte der Stützbeinphase während der kräftigen Abfußung belastet werden (Sonnichsen 1975).

Sportpferde, vor allem steil gefesselte Galopprennpferde sind dagegen für Schäden der oberflächlichen Beugesehne (OBS) prädisponiert, da diese am Ende der Stützbeinphase der höchsten Belastung ausgesetzt ist. Diese Läsionen der OBS finden sich meistens im mittleren Metacarpalbereich (Wilmink et al. 1992). Dabei sind zentrale Areale der Sehne stärker betroffen als periphere (Webbon 1977; Pool and Meagher 1990a; Marr et al. 1993; Birch et al. 1998). Die stark verlängerte erste Hälfte der Stützbeinphase bedingt die, vor allem bei Trabern häufige, Tendopathie des Fesselträgers (M. interosseus medius), dessen Hauptbelastung in der ersten Hälfte der Stützbeinphase liegt. In der zweiten Hälfte, während der Hyperextension der Zehe, nimmt der Zug auf den Fesselträger dann geringgradig ab (Fackelman 1973; Stashak 1989). Oft geht die Erkrankung des Fesselträgers mit Problemen der OBS einher, weil sich beide Strukturen in ihrer Funktion unterstützen. Als Ursache für klinisch erkennbare Sehnenschäden werden physikalische Faktoren wie Fehlstellungen, Fehlbelastungen, stumpfe Traumen und lokale Hyperthermie oder physiologische Faktoren, wie eine lokale Ischämie und Stoffwechselstörungen, angesehen (Stashak 1989; Dowling et al. 2000).

Es gibt verschiedene konservative und chirurgische Ansätze, um die Sehnenheilung im jeweiligen Stadium positiv zu beeinflussen und die Heilung zu verkürzen.

Subkutane Schwellungen können mit einem Druckverband zufriedenstellend eingedämmt werden. Zur Ruhigstellung kann ein Gips- oder Fiberglasverband angelegt werden. Üblicherweise wird zuerst die parenterale Verabreichung von nichtsteroidalen Antiphlogistika angewendet, um eine überschießende Entzündungsreaktion zu verhindern. Dagegen ist die lokale Verabreichung von Kortikosteroiden aufgrund der zu erwartenden dystrophischen Verkalkung im Sehnengewebe (Stashak 1989; Webbon and Williams 2002), sowie der histologisch deutlich sichtbaren Auflösung der kollagenen Fibrillen, der Reduzierung der Fibrozyten und Fibroblasten und der Ausfällung der Glykosaminoglycane kontraindiziert (Silbersiepe 1997).

In den letzten Jahren wird in der Pferdepraxis vermehrt die intratendinöse Injektion von Hyaluronsäure bei Tendopathien eingesetzt. Dadurch kann die Schmerzphase verkürzt und die Heilung und klinische Besserung beschleunigt werden (Schmidt and Henry 1989). Neben einer antiinflammatorischen Wirkung veranlaßt die Hyaluronsäure eine vermehrte Fibrillenbildung mit Aggregation der Kollagenmoleküle (Mohr 1987).

Als eine chirurgische Intervention kann die autologe Sehnentransplantation angeführt werden, sie gilt allerdings als aufwendig, teuer und die Rezidivgefahr ist unter voller Belastung extrem hoch (Fackelman 1973; Stromberg and Rejno 1978).

Die Implantation von Kohlenstoffasern in die erkrankte Sehne wird unterschiedlich bewertet. Während einige Autoren von ermutigenden Kurzzeiterfolgen berichteten (Littlewood 1979; McCullagh et al. 1979), weisen andere Autoren auf die Nachteile (geringe Elastizität des neugebildeten Gewebes, Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften, hohe Behandlungskosten) und auf die wenig erfolgreichen Behandlungsversuche hin (Pick 1987; Stashak 1989).

Erstaunlich gute Erfolge bei Erkrankungen des Bewegungsapparates werden durch die extrakorporale Stoßwellentherapie erzielt (Bosch et al. 2007). Der therapeutische Wirkungsmechanismus der Stoßwellentherapie, wird bis jetzt weder in der Human-, noch in der Tiermedizin wirklich verstanden. Es wurde lediglich festgestellt, daß gewisse Gewebshormone aufgrund der Stoßwellentherapie freigesetzt werden, und daß in Folge dessen neue Gefäße gebildet werden und Knochen umgebaut wird, was sich bei einer Knochenheilungsstörung oder Verletzungen der Sehnenanheftungsstellen am Knochen positiv auf die Heilung auswirkt (Schnewlin and Lischer 2001). Schon nach einer Ruhigstellung von ca. zwei Wochen kann

vorsichtig mit leichter passiver Arbeit begonnen werden. Es ist von Vorteil, frühzeitig mit der Arbeit zu beginnen, damit sich die Fibroblasten in Zugrichtung ausrichten können, um die Funktionalität des Gewebes wiederherzustellen (Yeung 1997).

Außerordentlich gute Erfolge, 80% Heilungserfolg, wurden mit dem Sehnensplitting erreicht (Webbon 1979). Ein Sehnensplitting wird zur Verbesserung der Vaskularisation und damit zur Verbesserung der Heilung des Defektes angewendet. Hierbei wird die Sehne in Längsrichtung inzidiert (ASHEIM 1964; Reiners et al. 2002), hinzu kommt eine fächerförmige Schnittechnik.

Mittlerweile gibt es auch erste experimentelle Ansätze zu Verwendung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmarkstroma zur Therapie von Verletzungen der oberflächlichen Beugesehne (Smith et al. 2003b; Awad et al. 1999b; Awad et al. 2000a; Smith 2008; Fortier and Smith 2008).

#### **1.4. Knochenläsion unterschiedlicher Genese**

Unter einer Fraktur versteht man den Verlust der strukturellen Einheit des Knochens. Meist ist ein Trauma vorangegangen, es kann aber auch zu so genannten Ermüdungsbrüchen kommen, die aufgrund einer Überlastung der Strukturen entstehen.

Der Knochen ist dadurch in seiner Funktion gestört. Diese Störung äußert sich in Lahmheiten unterschiedlichen Ausmaßes. Der Typ und der Grad der Lahmheit hängen von dem Bruch (Fissur, Fraktur, Chip-Fraktur) und dessen Lokalisation (Röhrenknochen oder Karpalknochen) ab. Besteht die Fraktur an einem das Körpergewicht tragenden Knochen, so kommt es zu einer hochgradigen Lahmheit; ist jedoch eine Chipfraktur vorhanden oder beispielsweise nur ein Karpalknochen betroffen, kann die Lahmheit auch geringgradig sein.

Durch eine angepasste Frakturbehandlung (Kompressionsosteosynthese) des Pferdeknochens erreicht man mittlerweile eine gute Stabilität des geschädigten Gewebes, und dies sogar mit einer geringgradigen Geflechtknochenbildung (Kallusbildung), die zu einer vollständigen Wiederbelastbarkeit der Gliedmaße führt. Da jedoch nach der Entfernung eines Implantates die Gefahr eines erneuten Bruches besteht, und zwar durch den Stabilitätsverlust aufgrund der entfernten Schrauben

und der damit verbleibenden Bohrlöcher, ist das Bestreben nach einer möglichst schnellen Durchbauung des gefährdeten Gewebes gewachsen.

Die Therapie der Osteomyelitis beinhaltet die Resektion des krankhaften Gewebes sowie die autologe Transplantation eines Spongiosastückes, das meist aus dem Beckenkamm entnommen wird, und zum Verschuß bzw. Überbrücken des Defektes eingesetzt wird. Dieses Vorgehen ist jedoch mit einem weiteren invasiven Eingriff verbunden.

An diese Behandlung schließt sich eine Therapie mit antibiotischen Arzneimitteln, sowie die Verabreichung von inflammatorischen Arzneimitteln, z.B. NSAIDs (nichtsteroidale Antiphlogistika), an.

Solche Knochendefekte könnten mit Hilfe eines Implantates mit mesenchymalen Stammzellen stabil geschlossen werden. Eine frühe Durchbauung des Knochens mit einer guten Belastbarkeit wäre bei Pferden von enormem Vorteil, da nicht die Frakturversorgung, sondern die Belastbarkeit aufgrund des hohen Körpergewichtes in der Pferdepraxis das zentrale Problem darstellt.

### **1.5. Stammzellen und deren therapeutische Einsatzmöglichkeiten**

Stammzellen lassen sich ihrem Ursprung nach unterscheiden. Man kann sie nach der Gewinnung aus dem jeweiligen Entwicklungsstadium einteilen:

- 1) frühembryonal
- 2) spätembyonal / neonatal
- 3) adult

Die Zellen frühembryonaler Stadien sind totipotent, d.h. sie können zu allen Gewebetypen differenzieren und sind in der Lage, komplette Organismen zu bilden. Diese Fähigkeit behalten sie bis zum 8-Zell-Stadium. Ein therapeutischer Einsatz von totipotenten Stammzellen ist allerdings mit einem großen Risiko verbunden, da aus diesen Zellen Tumore hervorgehen können.

Embryonale Stammzellen aus der Blastozyste sind pluripotent.

Die Zellen haben ihre Totipotenz bereits verloren und sind nunmehr in ihrer Differenzierungsfähigkeit eingeschränkt. Pluripotent bedeutet, daß sich die Zellen zu jedem Zell- und Gewebetyp eines erwachsenen Organismus differenzieren können

und theoretisch auch ganze Organe bilden können. Fetale Stammzellen werden z.B. aus dem Nabelschnurblut gewonnen.

Adulte Stammzellen werden als multipotent bezeichnet. Sie sind zwar immer noch in der Lage, sich in viele Richtungen zu differenzieren, haben aber den Großteil ihres Differenzierungspotentials bereits verloren.

Eine weitere Einteilung der adulten Zellen kann anhand des Gewebes durchgeführt werden, aus dem sie entnommen werden.

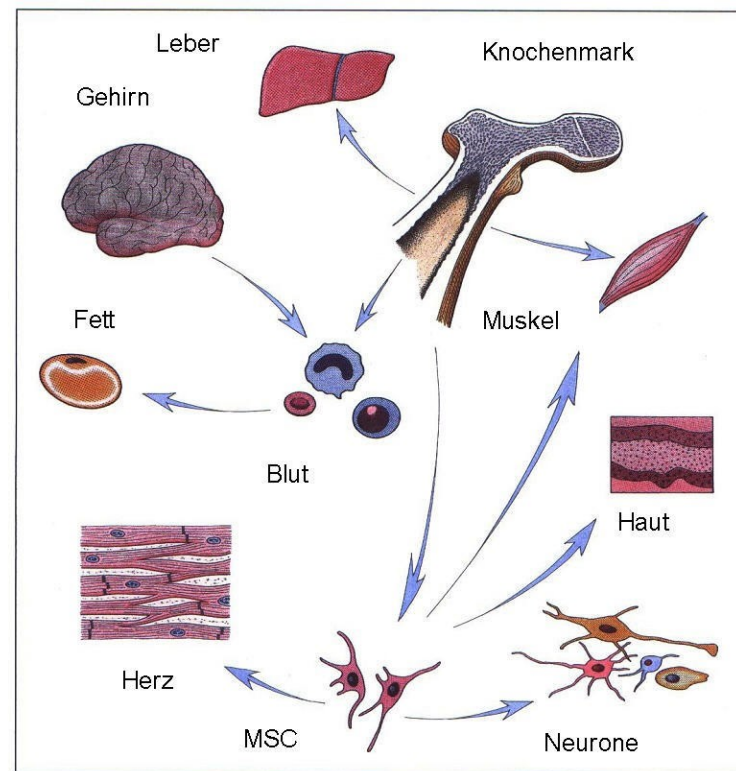
Adulte Stammzellen können aus folgenden Geweben gewonnen werden:

- 1) Blut = hämatopoetische Stammzellen
- 2) Gehirn = neurale Stammzellen
- 3) Knochenmark = mesenchymale Stammzellen

In der vorliegenden Arbeit werden adulte mesenchymale Stammzellen, die aus dem Knochenmark von Pferden isoliert werden, charakterisiert und ein therapeutischer Einsatz bei Sehnenläsionen geprüft.

Diese mesenchymalen Stammzellen, die aus dem Knochenmarkstroma isoliert werden, haben als autolog verfügbare Zellen in den letzten Jahren ein hohes Maß an wissenschaftlicher Aufmerksamkeit erregt. Sie können in einer relativ einfachen Prozedur aus den langen Röhrenknochen, Sternalpunktat oder den Beckenknochen im Zuge von chirurgischen Eingriffen gewonnen werden und anschließend unter Verwendung geeigneter Zellkulturprotokolle angereichert werden (Haynesworth et al. 1992; Krebsbach et al. 1999; Pittenger et al. 1999). Sie können innerhalb von zehn Wochen auf bis zu 20 - 50 Populationsverdopplungen expandiert werden (Devine 2002; Lee et al. 2003). Neben einer Differenzierung zu Knochen- und Knorpelzellen (Owen and Friedenstein 1988; Haynesworth et al. 1992) können sie auch in weitere Zelltypen wie Hepatozyten (Zhang et al. 2005), Endothelzellen (Shi et al. 1998), Herzmuskelzellen (Orlic et al. 2001) und Skelettmuskelzellen (Ferrari et al. 1998) differenzieren. Darüber hinaus ist auch die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Astrozyten und Neuronen in vitro gezeigt worden (Woodbury et al. 2000; Sanchez-Ramos et al. 2000). Nach Transplantation in das normale (Kopen et al. 1999) oder ischämische Gehirn (Azizi et al. 1998; Eglitis and Mezey 1997) (Arnhold et al. 2006b) differenzieren sie zu Astrozyten.





**Abb. 1 : Schema der Differenzierungsmöglichkeiten der adulten mesenchymalen Stammzelle**

Seit kurzer Zeit gibt es darüber hinaus Versuchsansätze, auch equine MSC aus Knochenmarkaspiraten zu isolieren und zu kultivieren, mit dem Ziel, sie für den therapeutischen Einsatz bei Degenerationen des Bewegungsapparates zu nutzen. Bei diesen Ansätzen handelt es sich hauptsächlich um die Bestrebung, die Knorpelregeneration bei Osteoarthritis durch die chondrogene Differenzierung der MSCs zu unterstützen (Fortier et al. 1998; Hegewald et al. 2004b). Darüber hinaus besteht, wie bereits erwähnt, ein erhöhtes Interesse, mesenchymale Stammzellen auch bei verzögerten Ossifikationen, im Rahmen von Frakturheilungen sowie bei Sehnenregeneration und anderen orthopädischen Erkrankungen einzusetzen.

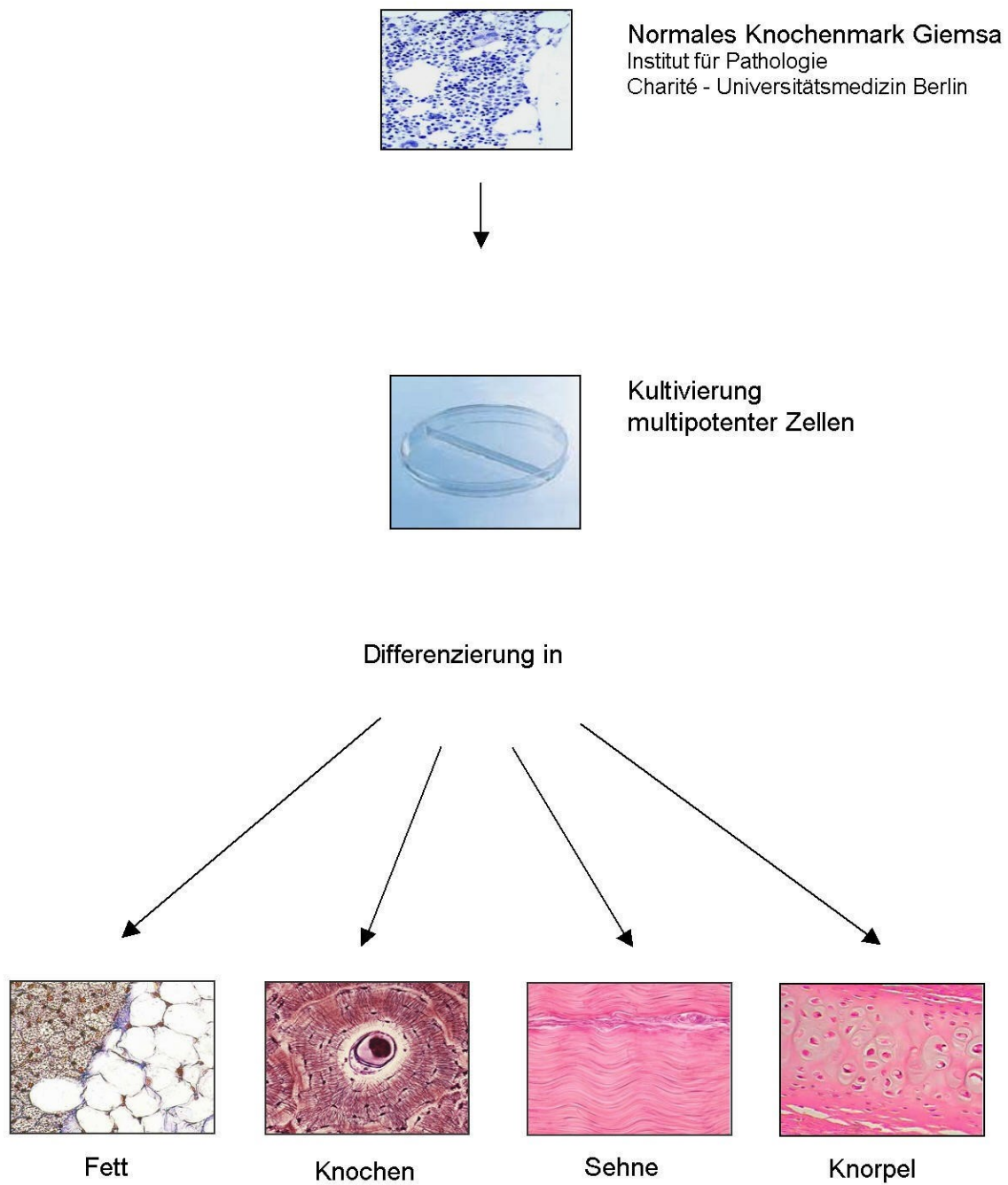
In der Humanmedizin ist ein Einsatz von mesenchymalen Stammzellen teilweise erprobt. Sie kommen bereits in der Knorpel- und Knochenregeneration zum Einsatz.

In der Tiermedizin, besonders in der Pferdepraxis, ist ein solcher therapeutischer Einsatz ebenfalls denkbar. Ziel dieses Vorgehens ist es, die langen Ausfallzeiten von Sportpferden zu beschränken oder sogar deren eventuelle Euthanasie zu verhindern.



Um diese eMSC erfolgreich als Therapeutikum einsetzen zu können, soll das Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung der Zellen sein. Dies beinhaltet die Isolation aus Sternalpunktat sowie deren Anreicherung und Expansion. Die Beurteilung des allgemeinen Proliferationsverhaltens, unter Standardbedingungen, als auch in Hypoxie. Ebenso soll die Kryokonservierbarkeit der Zellen getestet werden. Weitere wichtige Punkte der Charakterisierung ist die Pluripotenz der Zellen, sowie ihr Migrationsverhalten. Der letzte und wichtigste Schritt, für den therapeutischen Einsatz, ist die Beurteilung des Wachstums der Zellen auf einem Trägermaterial.

## Differenzierungsschema von adulten Knochenmarkstammzellen aus dem Sternum Aspirat vom Pferd



**Abb. 2 : Differenzierungsschema von adulten Knochenmarkstammzellen**

## 2. Material und Methode

### 2.1. Liste der verwendeten Materialien

100 bp DNA Ladder	Genecraft	Lüdinghausen	D
10x M-199 Medium Hank's Salts	Gibco	Unterschleißheim	D
2- Propanol	VWR	Darmstadt	D
Accutase	PAA	Cölbe	D
Agarose	peq-Lab	Erlangen	D
Aqua Poly/ Mount	Polyscience Inc.	Warrington	UK
Ascorbinsäure	Sigma	Steinheim	D
Bisbenzimid Hoechst Dye33342	Sigma	Steinheim	D
Bovines Serum Albumin	Sigma	Steinheim	D
CaCl <sub>2</sub> 20 mM	Westpfalz Klinikum	Kaiserslautern	D
CaCo-Dylat Puffer	Acros	Geel	B
Chlorhydrat	Merck	Darmstadt	D
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus	Hanau	D
Collagen (Rat Tail)	Roche	Mannheim	D
Cryoröhrchen	Nunc	Brand	D
Di-Natrium-carbonat	VWR	Darmstadt	D
Di-Natriumhydrogenphosphat-di-hydrat	VWR	Darmstadt	D
DMEM low Glucose	Biowest	Nuaillé	F
DMSO	Sigma	Steinheim	D
DNase I	Invitrogen	Carlsbach CA	USA
dNTP- Mix	Genecraft	Lüdinghausen	D
Donor Horse Serum	Biowest	Nuaillé	F
DTT	Invitrogen	Carlsbach CA	USA
EDTA	Sigma	Steinheim	D
Entellan	Merck	Darmstadt	D
Epon	Sigma	Steinheim	D
Essigsäure	Merck	Darmstadt	D
Ethanol	Merck	Darmstadt	D
Ficoll 400	Serva	Heidelberg	D
Fluoreszenz- Mikroskop, Axiovert	Zeiss	Oberkochen	D
Fluoreszenz-Mikroskop, Axiophot	Zeiss	Oberkochen	D
Formalin	Roth	Karlsruhe	D
Fötale Kälberserum	Biowest	Nuaillé	F
Fungizone	Sigma	Steinheim	D
Glucose	Merck	Darmstadt	D
Glutaraldehyd	Merck	Darmstadt	D
goat anti mouse	Aurion	Wageningen	NL
goat anti rabbit	Aurion	Wageningen	NL
Hämatoxylin	Merck	Darmstadt	D
HCl	Merck	Darmstadt	D
Heparin	Roche	Mannheim	D
Hepes	Sigma	Steinheim	D

ITS x100	Sigma	Steinheim	D
Kalialaun	Merck	Darmstadt	D
Labofuge 400	Heraeus	Hanau	D
L-Glutamine 200 mM 100x	Invitrogen	Carlsbach CA	USA
M- MLV Reverse Transcriptase + Puffer	Invitrogen	Carlsbach CA	USA
Maleat	Merck	Darmstadt	D
Methylenblau	Merck	Darmstadt	D
Mikropipetten/Variopipetten	Eppendorf	Hamburg	D
Multischalen 4 Well	Nunc	Brand	D
NaOH	VWR	Darmstadt	D
Natrium Citrat	Merck	Darmstadt	D
Natriumcarbonat	Merck	Darmstadt	D
Natrium-Chlorid	VWR	Darmstadt	D
Natrium-di-hydrogenphosphatmonohydrat	VWR	Darmstadt	D
Natrium-hydrogen-carbonat	VWR	Darmstadt	D
Natriumjodat	Merck	Darmstadt	D
NBT	Roche	Mannheim	D
Objektträger	VWR	Darmstadt	D
Oligo	MWG	Martinsried	D
Paraformaldehyd	VWR	Darmstadt	D
Pastuerpipetten	Brand	Wertheim	D
PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$	Biowest	Nuaillé	F
Penicillin- Streptomycin 10.000 U/ml	Invitrogen	Carlsbach CA	USA
Pikrinsäure	Merck	Darmstadt	D
Red Oil	Sigma	Steinheim	D
Silbernitrat	Merck	Darmstadt	D
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma	Steinheim	D
Sterilbank	Heraeus	Hanau	D
Sterilfilter 0,2 $\mu\text{m}$ Porendurchmesser	Schleicher & Schuell	Dassel	D
Taq- Polymerase + Puffer	Gencraft	Lüdinghausen	D
TGF $\beta$ 1	Sigma	Steinheim	D
Tissucol Duo	Baxter	Unterschleißheim	D
Toluidinblau	Merck	Darmstadt	D
Tris Borsäure EDTA	Merck	Darmstadt	D
Triton X- 100	Serva	Heidelberg	D
Trypanblau 0,4 %- Lösung	Merck	Darmstadt	D
Trypsin	Sigma	Darmstadt	D
Wasserbad	Heraeus	Hanau	D
$\alpha$ MEM	Biowest	Nuaillé	F
Zellkulturschalen 100 mm	VWR	Darmstadt	D
Zellkulturschalen 35 mm	VWR	Darmstadt	D
Zellkulturschalen 60 mm	VWR	Darmstadt	D

Tabelle 2 : Liste der verwendeten Materialien

## 2.2. Geräte der Zellkultur

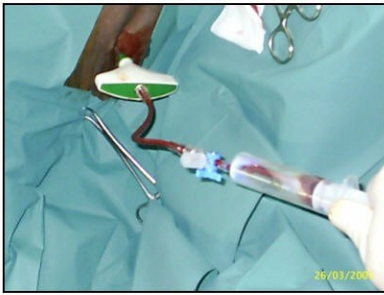
Das Kultivieren der Zellen fand in einer S1-Zellkultur unter sterilen Bedingungen statt, d.h. es wurden ausschließlich sterile bzw. autoklavierte Arbeitsgeräte und Materialien verwendet. In der Zellkultur wurden alle Tätigkeiten unter einer Reinraumwerkbank der Firma Heraeus (Hanau) durchgeführt, die mittels einer laminaren Luftströmung ein fast steriles Umfeld garantierte. Alle Zellen wuchsen standardmäßig in einem Brutschrank (Heraeus / Hanau) bei 37° C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

## 2.3. Gewinnung eMSC aus dem Sternumaspirat von Pferden

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Gewinnung von eMSC's, z.B. aus einem Sternumaspirat oder aus dem Beckenkamm. Die Entnahme des Knochenmarkes findet beim Pferd in der Regel aus dem Sternum statt. Dies geschieht entweder in Vollnarkose oder unter Sedation und Lokalanästhesie am stehenden Pferd.

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 34 Knochenmarkproben von Pferden unterschiedlichen Geschlechts und Alters gewonnen. Dabei handelte es sich um Warm- und Vollblutpferde.

Die Sedation wurde am stehenden Pferd mit Detomedin bei einer Dosierung von 0,5-0,7 ml durchgeführt (20-40 µg / KGW). Unter Vollnarkose behandelte Pferde, wurden mit Xylazin (0,6-1,0 mg / 100 kg KGW) über einen venösen Zugang sediert. Anschließend mit Ketamin (200 mg / kg KGW), Diazepam (2 mg / 100 kg KGW) und Myolaxin 15 % (45 mg / kg KGW) abgelegt. Nachdem der 3.-4. Intersternalraum sonographisch erfaßt und markiert wurde, wurde die entsprechende Stelle rasiert und desinfiziert und somit auf den Eingriff vorbereitet. Das Operationsgebiet wurde mit 1-2 ml Lidocain 2% lokal anästhesiert. Nachdem der entnehmende Tierarzt mit einem Skalpell der Größe 11 einen ca. 0,5 cm großen Hautschnitt gesetzt hatte, führte er eine Jamshidi-Nadel (Entnahmekanüle) 10 G (Fa. Terumo, Eschborn) in den markierten Intersternalraum ein und entnahm damit das Knochenmark (KM) aus dem Sternum. Das frisch gewonnene KM wurde sofort in ein Transportmedium überführt und gekühlt aufbewahrt. Die Probe wurde anschließend, innerhalb von maximal 24 Stunden, in ein Labor gebracht. Zur Vorbeugung einer Infektion, bekamen die Pferde 20 ml Gentamicin (4 mg / KGW) und ein antiphlogistisch wirksames Schmerzmittel, 20 ml Flunixin (1 mg / KGW), beides i.v. injiziert.

**Abb. 3 : Knochenmark des Pferdes**

Entnahme des Knochenmarkes vom  
narkotisierten Pferd  
Praxis Rohde, Bonn

**Abb. 4 : Knochenmark auf Eis**

Knochenmark in Transportmedium auf Eis  
für den Transport ins Labor

## 2.4. Aufbereitung von equinem Knochenmark

Nach Erhalt der Probe, Sternumaspirat in Transportmedium, wurde diese umgehend in zwei 50 ml Falconröhrchen überführt. Das Sternumaspirat wurde dafür über einen Filter mit einer Maschengröße von 70  $\mu\text{m}$  filtriert, um vorhandene Koagulate und große Lipidtropfen aus der Probe zu entfernen. Beide Röhrchen wurden daraufhin mit kalter 0,1 M PBS-Puffer-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Es war unbedingt erforderlich, daß der Puffer kalt auf die Proben appliziert wurde, damit auch die während des Transportes gekühlten Zellen keinen nennenswerten Temperaturschwankungen ausgeliefert waren. Es sollte lediglich ein allmählicher Temperaturanstieg auf die gleichbleibende Kultivierungstemperatur von 37° C erfolgen.

Der erste Zentrifugierschritt erfolgte bei 169,34 g für 10 Minuten. Die Zellen sanken durch das Zentrifugieren nach unten auf den Grund des Röhrchens. Der Puffer wurde nach dem Zentrifugieren abgesaugt und die Probe wurde erneut auf 50 ml mit PBS-Puffer aufgefüllt. Ein zweiter Waschschrift erfolgte. Da die Probe bereits einmal gewaschen wurde, benötigten die Zellen zum Absinken keine so hohe Umdrehungszahl mehr, so daß die Zeitspanne, ebenso wie die Geschwindigkeit, zur Schonung der Zellen, verringert werden konnte. Bei diesem zweiten Waschschrift wurden die Zellen somit nur bei 75,26 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt. Die Pellets wurden mit jeweils einem ml Kultivierungsmedium 1 (Standardmedium) resuspendiert und auf je eine 100 mm

Falconschale pipettiert. Es wurden pro Schale jeweils weitere 9 ml vom Kultivierungsmedium 1 in die Schale gegeben, damit sich ein endgültiges Volumen von 10 ml in einer 100 mm Falconschale befand.

Das Transportmedium für eMSC setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

α MEM

Penicillin / Streptomycin 2%

Heparin 0,5%

Das Standardmedium (Kultivierungsmedium 1) enthielt folgende Komponenten:

α MEM Basalmedium ohne Glutamin

Penicillin / Streptomycin 2%

Glutamin 1%

Fetal Calf Serum (Foetales Kälberserum = FCS) Serum 20%

## **2.5. Durchführung des Medienwechsels**

Ein Medienwechsel ist notwendig, damit die Zellen zum einen mit neuen Nährstoffen versorgt werden und zum anderen damit die Stoffwechselprodukte der Zellen bzw. toxische Substanzen nach Zerfall beseitigt werden können. So wirkt Glutamin zelltoxisch, wenn es zu lange in Medium gelöst ist und zerfällt. Ein Medienwechsel wurde sowohl bei Monolayer- als auch bei 3-D-Kulturen durchgeführt. Die Häufigkeit des Medienwechsels war je nach Kultivierungsform unterschiedlich (2-5 Tage).

Nach dem Absaugen des Mediums aus der Kulturschale wurde sofort frisches Medium auf die Kultur gegeben, so daß eine Austrocknung verhindert werden konnte.



## 2.6. Der Vorgang des Passagierens

Das Passagieren ist der Vorgang bei dem die Zellen einer Kultur in bestimmten Zeitabständen ausgedünnt werden, um eine zu große Zelldichte zu verhindern. Die Zeitabstände richten sich nach dem Proliferationsverhalten der Zellen. Bei guter Proliferation sind die Zeitabstände deutlich geringer als bei weniger proliferierenden Zellen. Die Zellen sollten ab einer Zelldichte von ca. 80% Konfluenz passagiert werden. Wird die Zelldichte einer Stammzellkultur größer als 80%, beginnen die Stammzellen auszdifferenzieren oder sich von der Schale abzulösen bzw in mehreren Schichten übereinander zu wachsen. Beim Passagieren kommt es dann zu Verklumpungen.

Als erstes wurde das Medium aus der Schale abgesaugt, danach wurde die Schale mit steriler PBS-Puffer-Lösung gespült. Der Puffer verblieb ca. 1 Minute auf den Zellen. Die hierbei stattfindenden Ionenaustauschprozesse, zwischen Puffer und Zellen, sollten ein leichteres Ablösen der Zellen garantieren. Die Pufferlösung wurde abgesaugt und es wurden 2 ml Accutase auf die Zellen gegeben. Dieses Enzymgemisch (selbst inaktivierend) sorgte dafür, daß sich die Zellen endgültig von ihrer Unterlage ablösten. Damit das Enzymgemisch optimal wirken konnte, wurden die Zellen für 3 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Falconröhrchen überführt, in dem bereits 8 ml Medium vorgelegt waren. Das Röhrchen wurde 5 Minuten bei 75,26 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Medium abgesaugt, das sichtbare Zellpellet verblieb im Röhrchen. Auf dieses Pellet wurde 1 ml Medium gegeben und resuspendiert, damit sich die Zellen vereinzeln konnten. Nun konnten die Zellen wieder ausgesät werden. Pro cm<sup>2</sup> Schale wurden 500 Zellen ausgesät. Die Anzahl der Zellen pro ml wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anhand der Zellzahl pro ml konnte somit berechnet werden, wie viel µl von der Probe in Kulturschalen unterschiedlicher Größe eingesetzt werden mußten.

## 2.7. Kryokonservierung mit Protektion der Zellen

Das Einfrieren der Zellen diente dazu, diese für einen möglichst langen Zeitraum zu konservieren. Der Ablauf war dem des Passagierens ähnlich. Ab einer Konfluenz von

80% wurden die Zellen von ihrer Schale enzymatisch abgelöst und anschließend wieder von dem verwendeten Enzymgemisch gereinigt. Vorbehandlung und weiteres Vorgehen wurden bereits beim Passagieren beschrieben. Schließlich wurden die Zellen in einem Milliliter Freezing Medium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Währenddessen wurde der Einfriercontainer Nalgene, Firma Nalge (Hereford, UK), Cryo 1°C Freezing Container vorgekühlt. Der Einfriercontainer ermöglicht es, die Zellen oder Gewebe möglichst sanft einzufrieren, was zu einem besseren Gewebs- bzw. Zellerhalt führt. Er wurde mit Isopropanol gefüllt, was dazu führte, daß die Temperatur in seinem Inneren jede Minute um konstant ein Grad sank, bis die Umgebungstemperatur von -80°C erreicht war. Das Röhrchen wurde in dem Container für 1,5-2 Stunden in den -80°C Tiefgefrierschrank gestellt, um es danach in flüssigem Stickstoff bei -196°C zu lagern. Dieses Vorgehen garantiert eine nahezu unbegrenzte Lagerungsmöglichkeit.

Folgendes Einfriermedium wurde verwendet (Freezing Medium):

DMSO 5%

α MEM

FCS resuspendiert 30%

## **2.8. Auftauen der kryokonservierten Zellen**

Das Auftauen der Zellen sollte innerhalb von einer Minute erfolgen, da das DMSO, welches im Einfriermedium enthalten ist, zwar ein gutes Zellprotektivum beim Einfrieren der Zellen ist, es jedoch einerseits extrem toxische Eigenschaften und zum anderen einen differenzierenden Einfluss auf die Zellen hat, wenn es im erwärmten Zustand mit ihnen in Berührung kommt.

Deshalb wurden die Zellen, sobald sie aus dem flüssigen Stickstoff entnommen wurden, in einem Wasserbad bei 37° C innerhalb einer Minute aufgetaut. Jetzt konnte die Zellsuspension in ein Falconröhrchen, in dem 10 ml Medium vorgelegt waren, überführt werden. Das vorgelegte Medium sollte das Einfriermedium aus den Zellen auswaschen. Das Medium sollte kalt sein, damit der Temperaturunterschied nicht zu groß ist. Schließlich wurden die Zellen wieder

zentrifugiert, so daß ein Pellet entstand. Das geschah wieder in einem Zentrifugationsschritt bei 75,26 g für 5 Minuten.

Der Medienüberstand wurde abgesaut und eine erneute Resuspension mit dem Kultivierungsmedium durchgeführt. Die Zellen wurden nun wieder auf einer Schale ausplattiert. Eine kreisförmig durchgeführte Bewegung der Schale in Achtertouren garantierte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Schale und wirkte einer Verklumpung entgegen.

## **2.9. Colony Forming Units Fibroblast (CFU-F)**

Es wurde ein CFU-F Assay zur Evaluierung des selbsterneuernden Potentials der eMSC in Kultur verwendet. Hierzu wurden definierte Zellzahlen von 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 10.000 und 50.000 Zellen pro 100 mm Falconschale appliziert. Die Kultivierung erstreckte sich über einen Zeitraum von 14 Tagen mit dem Standardmedium (mit 20% FCS s.S. 22). In dieser Zeit fand kein Medienwechsel statt.

Nach dem Kultivierungszeitraum wurde das Medium von den Schalen entfernt und die Zellkolonien mittels Cresylviolett (Sigma / Steinheim) nachgewiesen. Dazu wurde Cresylviolett in die Schale pipettiert. Nach zehn Minuten wurde die Farblösung von den Schalen mit Puffer abgespült. War die Spüllösung in der Schale klar, dann konnte der Waschvorgang beendet werden. Somit waren Farbartefakte auf den Schalen ausgeschlossen.

Bei den anschließend sichtbaren blaugefärbten Arealen handelte es sich um die einzelnen Zellkolonien.

## **2.10. Nachweis der Zellmigration (wounded healing assay)**

Zum Nachweis der Zellmigration wurde eine 60 mm Falconschale mit eMSC solange kultiviert (Kultivierungsmedium 1) bis die Population eine Konfluenz von 80-90% erreichte. War die gewünschte Zelldichte erreicht, wurde mit einer blauen Pipettenspitze mit einem Durchmesser von 0,9 mm ein Kratzer durch den konfluenten Zellrasen gezogen, so daß der konfluente Zelllayer lokal zerstört wurde.

Mittels eines Vitalbeobachtungssystems (Axiovert Zeiss / Oberkochen) sollte, im Rahmen dieses Scratch Assay, das Migrationsverhalten der Zellen studiert werden, d.h. es sollte die Migration der Zellen in das zellfreie Areal beurteilt werden.

## 2.11. Untersuchung der Zellproliferation

Die Zellen wurden in verschiedenen Medien ( $\alpha$  MEM und DMEM [high Glucose]) und mit verschiedenen Seren, die zu den verwendeten Medien gehörten (Foetales Kälberserum, drei verschiedene adulte Pferdeseren und ein Fohlenserum) über etliche Passagen (bis Passage 14) kultiviert ( $n = 3$ ). Die Serumkonzentration aller equinen Seren lag bei 10%, die des bovinen Serums bei 20% (Tab. 3). Anhand der Proliferationsrate sollte ermittelt werden, welches Medium in Kombination mit welchem Serum am besten für eine Kultivierung von eMSC geeignet war. Die zu bestimmenden Parameter lagen zum einen in der Proliferationsgeschwindigkeit und zum anderen in der Anzahl der durchlaufenen Passagen. In diese Bewertung floß auch eine morphologische Beurteilung der Zellen und ihre Differenzierungskapazität ein.

Dazu wurden eMSC mit 500 Zellen pro  $\text{cm}^2$  in eine 35 mm Rasterschale (Falcon) der Firma VWR / Darmstadt ausgesät. Es wurden vier Kästchen pro Schale markiert. Diese Kästchen wurden alle zwei Tage mikroskopisch mit einer 100-fachen Vergrößerung aufgesucht und ausgezählt. Außerdem wurden die Kästchen mittels einer digitalen Kamera und der Software Image-pro-Express (Media Cybernetics, East-West Hwy, USA) aufgenommen. Die Proliferation der eMSC wurde über mehrere Passagen verfolgt. Das Passagieren erfolgte bei einer Zelldichte zwischen 75-90%.

Folgende Kultivierungsmedien wurden eingesetzt:

### Kultivierungsmedium 1

(Standardmedium):

$\alpha$  MEM Basalmedium ohne Glutamin

Penicillin / Streptomycin 2%

Glutamin 1%

Fetal Calf Serum 20%

### Kultivierungsmedium 2:

$\alpha$  MEM Basalmedium ohne Glutamin

Penicillin / Streptomycin 2%

Glutamin 1%

Donor Horse Serum 10%

**Kultivierungsmedium 3:**

DMEM Basalmedium ohne Glutamin

Penicillin / Streptomycin 2%

Glutamin 1%

Fetal Calf Serum 20%

**Kultivierungsmedium 4:**

DMEM Basalmedium ohne Glutamin

Penicillin / Streptomycin 2%

Glutamin 1%

Donor Horse Serum 10%

<b>α MEM</b>					
<b>Seren:</b>	<b>Pferd adult</b>	<b>Pferd adult</b>	<b>Pferd adult</b>	<b>Pferd Fohlen</b>	<b>Rind</b>
<b>Firma</b>	Biowest	Biowest	Biowest	Biowest	Gibco
<b>Cat N°</b>	S0900	S0900	S0900	S0800	REF 10270-106
<b>Lot°</b>	S04087S0900	S03552S0900	S04560S0900	S03625S0800	40G 6441K
<b>Inhalt:</b>	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	500 ml
<b>Interne Nummer:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Anteil in % am Medium</b>	10	10	10	10	20

<b>DMEM</b>					
<b>Seren:</b>	<b>Pferd adult</b>	<b>Pferd adult</b>	<b>Pferd adult</b>	<b>Pferd Fohlen</b>	<b>Rind</b>
<b>Firma</b>	Biowest	Biowest	Biowest	Biowest	Gibco
<b>Cat N°</b>	S0900	S0900	S0900	S0800	REF 10270-106
<b>Lot°</b>	S04087S0900	S03552S0900	S04560S0900	S03625S0800	40G 6441K
<b>Inhalt:</b>	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	500 ml
<b>Interne Nummer:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Anteil in % am Medium</b>	10	10	10	10	20

**Tabelle 3 : Verwendete Seren zur Zellproliferation in α MEM und DMEM**

## **2.12. Untersuchung der Zellvitalität der eMSC bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen**

Im Hinblick auf einen zukünftigen Versand der Zellen an Tierärzte und Tierkliniken, im gesamten Bundesgebiet und in das europäische Ausland, wurde die Vitalität der Zellen bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen ermittelt. Dazu wurde eine definierte Zellzahl, hier 1 Million Zellen in 1 ml Medium, zum einen auf Eis und zum anderen bei +4°C im Kühlschrank, über definierte Zeiträume aufbewahrt (n = 6).

Nach 1, 5, 12, 21 und 26 Stunden wurde eine Vitalfärbung mittels Trypanblau durchgeführt und mit einer Neubauerzählkammer die Anzahl der lebenden und der toten Zellen ermittelt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten ausplattiert, um ihre Fähigkeit zur Adhärenz und Proliferation zu überprüfen.

## **2.13. Untersuchung auf Pluripotenz der eMSC**

Um die Pluripotenz der eMSC zu ermitteln, wurde das Differenzierungspotential der Zellen, sowohl an nativen als auch an kryokonservierten Zellen, in Richtung Fett-, Knorpel- und Knochengewebe gezeigt (n = 10). Dazu wurden die Zellen nach dem Passagieren auf sterile Deckgläschen in 4-Multiwell-Schalen (Nunc / Wiesbaden) ausplattiert. Das Kultivieren auf den Glasplättchen diente dem späteren Herausnehmen der Zellen aus den Schalen, so daß sie nach den entsprechenden Nachweisverfahren problemlos auf einen Objektträger gelegt und als Dauerpräparate eingedeckt werden konnten. Für die Chondrozytendifferenzierung mußten die Zellen in einer 3-D-Kultur differenziert werden. Dazu wurden 300.000 Zellen in ein 15 ml Falcon Röhrchen pipettiert und, bevor die Röhrchen mit den Zellen in den Brutschrank gelangten, wurden die Zellen nochmals bei 75,26 g für 5 Minuten abzentrifugiert.

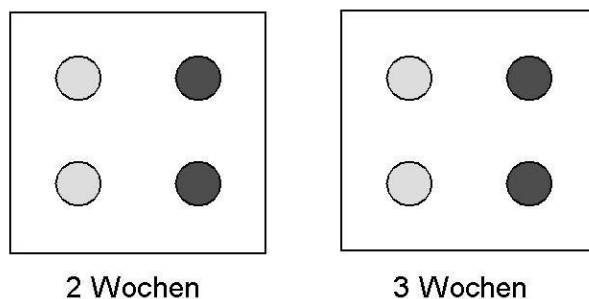
Für die Differenzierung mußten die Zellen für 3 Wochen in den Differenzierungsmedien verbleiben. Nach Kultivierung im entsprechenden Differenzierungsmedium wurde die Differenzierung nach Ablauf der Versuchsdauer durch Fixierung abgestoppt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe spezifischer histologischer Färbungen bzw. unter Verwendung entsprechender Knorpelmarker. Für die adipogene Differenzierung diente die histologische Färbung Red Oil als spezifischer Nachweis. Zum Nachweis

der osteogenen Differenzierung wurde die histochemische Van-Kossa-Färbung verwendet. Die Knorpeldifferenzierung wurde zunächst mittels der histologischen Toluidinblaufärbung durchgeführt, zusätzlich wurde der Knorpelnachweis mittels RT-PCR unter Verwendung von Primern für Collagen II und Aggrecan erbracht.

### 2.13.1. Adipozyten- und Osteozytendifferenzierung

Für die adipogene bzw. osteogene Differenzierung wurden folgende Versuchsanordnungen angesetzt:



**Abb. 5 : Schemazeichnung Adipozyten- und Osteozytendifferenzierung:**

Unterteilung der Wells in Kontroll-Medium (hellgrau) und Kultur mit Adipozytenmedium bzw. Osteozytenmedium (dunkelgrau).

#### osteogenes Differenzierungsmedium:

76 ml  $\alpha$  MEM Basalmedium ohne Glutamin  
 1 ml Penicillin / Streptomycin  
 1 ml Glutamin  
 1 ml Fetal Calf Serum  
 1 ml  $\beta$ -Glycerophosphat 1 M  
 6 ml Ascorbinsäure 1 mM  
 100  $\mu$ l Fungizone  
 10  $\mu$ l Dexamethason 1mM

#### adipogenes Differenzierungsmedium:

82 ml  $\alpha$  MEM Basalmedium ohne Glutamin  
 1 ml Penicillin / Streptomycin  
 1 ml Glutamin  
 15 ml Fetal Calf Serum  
 500  $\mu$ l ITS x100  
 100  $\mu$ l Fungizone  
 100  $\mu$ l Dexamethason  
 1,073  $\mu$ l / 500  $\mu$ l Indomethacin

Alle Angaben beziehen sich auf einen Ansatz von 100 ml Medium.

### 2.13.2. Chondrozytendifferenzierung

Für die Chondrozytendifferenzierung wurden jeweils 300.000 Zellen in 6 Falcon-Röhrchen (15 ml) überführt. Jeweils drei der Röhrchen wurden vorab mit Kultivierungsmedium 1, die übrigen drei Röhrchen mit Chondrozytenmedium befüllt. Die zugegebene Menge Medium pro Falconröhrchen betrug 500 µl.

#### Chondrogenes Differenzierungsmedium 100 ml:

92 ml DMEM Basalmedium low glucose  
1 ml Penicillin / Streptomycin  
1 ml Glutamin  
1 ml Fetal Calf Serum  
50 µl ITS x100  
100 µl Fungizone  
5 µl TGFβ (1 µg / ml)

#### Medienwechsel in der Differenzierung:

Der Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage.

### 2.14. Kultivierung der eMSC unter Sauerstoffreduktion

Da im Knochenmark eine niedrigere Sauerstoffspannung herrscht als in sonstigen Geweben, wurden zur Untersuchung der Proliferationsfrequenz die Zellen in einer Atmosphäre mit einem reduzierten Sauerstoffgehalt kultiviert. Diese Untersuchung sollte Aufschluß über das Zellverhalten unter diesen Bedingungen geben. Die Zellen wurden nach der Aufbereitung mit 2000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in einer 100 mm Falcon-Schale plattiert und in eine Hypoxiekammer (Modular incubator chamber), der Firma Billups-Rothenberg, gestellt und in dieser in einem CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank platziert. Die Zellzahl wurde in diesem Versuchsansatz von 500 auf 2000 Zellen erhöht, um die Passagedauer zu verkürzen. So konnte dieser Versuch innerhalb einer Woche durchgeführt werden, ohne daß die Zellen sich aufgrund des Alterungsprozesses, der sich bei einer Kultivierung mit 500 Zellen über 3 Wochen erstreckt, unterschieden. Die Zellen wurden ebenfalls bei 37° C und bei einem CO<sub>2</sub>-



Gehalt von 5% kultiviert. Die Sauerstoffkonzentration betrug nur 3% und die Stickstoffkonzentration 92%.

Nach Erreichen einer Konfluenz von 85-90% wurden die Zellen von der Schale abgelöst und ausgezählt. Danach wurden die Zellen erneut mit gleicher Zellzahl ausgesät und weiter kultiviert. Eine weitere Zellpopulation wurde zum Vergleich unter Standardbedingungen (21% O<sub>2</sub>) kultiviert. Für die weitere Kultivierung wurden jeweils die Zellen aus den beiden Ansätzen weiterverwendet, um eine mögliche Adaption an den erniedrigten Sauerstoffgehalt nachvollziehen zu können.

Anhand der Auszählung der Zellen aus den beiden Ansätzen konnte die Generationsverdopplungszeit mit Hilfe der unten stehenden Formel berechnet werden.

Berechnung der Generationsverdopplungen und der Generationszeit

Die Generationsverdopplung wurde mit der Formel berechnet:

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

Die Generationszeit wurde mit der Formel:  $t_G = t/n$  berechnet.

t = Zeit in Stunden vom Aussähen bis Zählen

n = Generationsverdopplung

N = Zahl der Zellen

N<sub>0</sub> = Zellzahl bei der Ausplattierung

t<sub>G</sub> = Generationszeit

## 2.15. Zellaufbereitung für die histologische Untersuchung

### 2.15.1. Fixierung mittels Paraformaldehyd

Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium vollständig von den Zellen abgesaugt, bevor dann ein Waschschriff mittels 0,1 M phosphat buffered saline (PBS) durchgeführt wurde. Die 4%-Paraformaldehydlösung (PFA) in 0,1 M PBS, wurde auf die Zellen gegeben und bei 37° C im Brutschrank für 20 Minuten inkubiert. Das Prinzip der Fixierung funktionierte so, daß die NH<sub>2</sub>-Gruppen membranärer und zellulärer Proteine über die Aldehyde miteinander vernetzt wurden, und so die Zellen in ihrer Struktur erhalten blieben. Anschließend wurde das PFA mittels drei

aufeinander folgender Waschschritte, unter Verwendung von 0,1 M PBS, eliminiert und die Zellen in 0,1 M PBS der Immunzytochemie bzw. der Histologie zugeführt.

Diese Art der Fixierung wurde bei allen immunzytochemischen Verfahren und bei den histologischen Färbemethoden für die osteogene (NBT) und adipogene (Red Oil) Differenzierung, die in dieser Arbeit behandelt werden, angewendet.

#### **2.15.2. Fixierung mittels Methanol / Aceton für die Van Kossa-Färbung**

Vor der Fixierung wurde auch hier das Medium entfernt und ein Spülschritt mit PBS durchgeführt, wie bereits bei der Fixierung mit PFA beschrieben.

Im nächsten Schritt wurde ein Methanol-/Aceton-Gemisch im Verhältnis 1:1 auf die Zellen gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend mit der Van-Kossa-Färbung, zum Nachweis der Kalzifizierung, gefärbt (s.u.).

#### **2.15.3. Fixierung mittels Glutaraldehyd / Pikrinsäure**

Das Medium wurde von den Proben abgesaugt und die Fixierung wurde ohne vorherigen Waschschritt auf die Proben gegeben. Die Zellen wurden je nach Versuchsbedingungen (Kultur auf Microcarriern oder Fibrinbeads) für 30-45 Minuten bei Microcarriern und bei Fibrinbeads für 1 Stunde bei 4° C inkubiert. Danach wurde mit 0,1 M CaCo-Puffer dreimal gewaschen. Die Zellen standen jetzt auf ihren Trägermaterialien für die Einbettung in Epon bereit.

Fixierlösung:

800 µl Glutaraldehyd

20 µl Pikrinsäure 25%

100 µl 0,1 M CaCo Puffer pH 7,35

9,08 ml Aqua dest.

## **2.16. Histologische Nachweisverfahren**

### **2.16.1. Red Oil Färbung zum Nachweis der adipogenen Differenzierung Hämatoxin Gegenfärbung nach Mayer**

Mit Hilfe der Red-Oil-Färbung können im Gewebe und auf Zellkulturen Neutralfette nachgewiesen werden.

Dazu wurde die PBS-Lösung, in der die Zellen nach der Fixierung standen, abgesaugt. Die Zellen wurden mit Aqua dest. gespült. Danach wurde die Färbelösung appliziert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Nun erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxin. Dieser Farbstoff sollte 4 Minuten einwirken. Anschließend wurde erneut mit Aqua dest. gespült und daran anknüpfend mit Leitungswasser für vier Minuten gebläut. Die Einbettung erfolgte in Glycerin-Gelatine.

Red Oil:

4 Teile Red Oil

6 Teile Aqua dest.

Hämatoxin Herstellung nach Mayer (Romeis)

In 1000 ml Aqua dest. 1g Hämatoxylin lösen

200 mg Natriumjodat

50 g Kalialaun

50 g Chlorhydrat

1 g Zitronensäure

### **2.16.2. NBT/BCIP Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung (ALP Färbung) zum Knochennachweis**

Mit dieser Färbung wurde die Alkalische Phosphatase, welche die Zellen während Ihrer Differenzierung exprimiert hatten, nachgewiesen. Die Farbintensität gibt einen Anhaltspunkt über den Grad der Bildung von Knochenmatrix.

Nach der Fixierung und Absaugen des Puffers, mußten die Zellen gründlich

In Aqua bidest. gewaschen werden, da die Färbetabletten in Aqua bidest. gelöst wurden und eine unspezifische Reaktion durch mineralisiertes Wasser auszuschließen war.

Die Lösung wurde auf die Zellen gegeben und nach ca. zwei Minuten, aber vor allem unter Sichtkontrolle, mit Aqua bidest. abgestoppt. Eine Gegenfärbung mit Kernechtrot schloß sich an. Die Proben wurden nach der Färbung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, 70%, 90% kurz und bei 100% für zwei Minuten, entwässert. Zum Schluß wurde die sich auf dem Deckgläschen befindliche Probe in Xylol getaucht und umgekehrt auf einem Objektträger mit Entelan zur dauerhaften Fixierung eingebettet.

NBT:

Aqua bidest. 10 ml

1 Tablette NBT

#### **2.16.3. Van-Kossa-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung, zum morphologischen Kalknachweis (BTT)**

Die Van-Kossa-Färbung, die zum Kalzifizierungsnachweis der mineralisierten Extrazellulärmatrix diente, induzierte eine schwarze Färbung des mineralisierten Knorpel- und Knochengewebes. Zellen und Weichgewebe stellten sich, je nach Gegenfärbung, rot oder grün dar.

Nach der Methanol-/Aceton-Fixierung wurde für 5 Minuten Aqua dest. auf die Zellen gegeben. Im nächsten Arbeitsschritt wurde eine 5%ige Silbernitrat-Lösung appliziert und 30-60 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Zur Reduktion wurden die Zellen 5 Minuten mit einer Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung überschichtet, welche anschließend für 10 Minuten in ständig wechselndem Leitungswasser ausgewaschen wurde. Zur Darstellung der Zellen wurde eine Gegenfärbung mit einer Kernechtrot-Färbung durchgeführt, die 5-10 Minuten auf den Zellen verblieb. Ein finaler Waschvorgang mit Aqua dest. erfolgte, bevor die Zellen auf einem Glasobjektträger in Gelatine eingedeckt wurden.

Van-Kossa-Färbung:

5% Silbernitrat-Lösung

5% Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung

#### **2.16.4. Metachromatische Toluidinblau Färbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung**

Die Toluidinblaufärbung dient dem Nachweis saurer Mukopolysaccharide. Solche Mukopolysaccharide kommen in der Knorpelgrundsubstanz vor.

Dazu wurden die Zellpellets in Paraffin eingebettet, geschnitten und getrocknet.

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte für 20 Minuten in Toluidinblau gefärbt. Eine anschließende Differenzierung in 0,5% Essigsäure sollte eine klare Kernfärbung ergeben.

Nach der Differenzierung wurden die Schnitte in Wasser abgespült und zwischen Filterpapier getrocknet. Eine Einbettung in Entellan, zur Herstellung von Dauerpräparaten, schloß sich an.

Toluidinblaufärbung:

Toluidinblau 0,8% wässrige Lösung, pH 4

Essigsäure 0,5%

#### **2.16.5. Alzianblaufärbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung**

Als alternatives Nachweisverfahren der chondrogenen Differenzierung wurde eine Alzianblaufärbung, ebenfalls zum Nachweis saurer Mukopolysaccharide, durchgeführt. Auch hier erfolgte eine Gegenfärbung der Kerne mit Kernechtrot.

Hierfür wurden die Schnitte ebenfalls entparaffiniert und für 40 Minuten in Alzianblau gefärbt. Ein Spülschritt mit destilliertem Wasser und anschließender fünfminütiger Gegenfärbung in Kernechtrot folgte. Ein erneuter Waschschrift der Schnitte in Wasser schloß sich an. Zur Entwässerung durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe, zum Schluß wurden sie kurz in Xylol getaucht. Die Einbettung erfolgte in Entellan.

Alzianblaufärbung:

Alzianblau 0,5 g

Eisessig 1 ml

Aqua dest. 100 ml

## 2.17. Immunhistochemie

### 2.17.1. Prinzip der Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie werden mit Hilfe von Antikörpern bestimmte Gewebestrukturen spezifisch markiert und dargestellt. Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Gammaglobuline. Sie spielen im Körper eine wichtige Rolle bei der spezifischen Immunabwehr, indem sie Krankheitserreger, körperfremde Proteine oder Phospholipide erkennen und an diese binden. So werden z.B. Viren neutralisiert oder Bakterien markiert, was entweder andere Abwehrzellen chemotaktisch anlockt, die diese abtöten und phagozytieren, oder das Komplementsystem (eine Proteinkaskade) aktiviert, so daß Keime direkt zerstört werden. Antikörper werden in Plasmazellen, speziellen B-Lymphozyten gebildet. Es gibt folgende Klassen: IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Für die Immunhistochemie spielen in erster Linie Antikörper der Klasse IgG eine Rolle, auf die im folgenden genauer eingegangen wird. Diese Antikörper sind y-förmige Proteinmonomere mit einem Molekulgewicht von ca. 150.000 Dalton. Sie bestehen aus zwei Abschnitten, dem Fab-Fragment und dem Fc-Stück. Das Fab-Fragment ist die y-förmige Gabel und erkennt spezifisch die Bindungsregion am Antigen. Antikörper und Antigen funktionieren wie das Schlüssel-Schloß-Prinzip. Das Fc-Stück ist dagegen spezifisch für die Antikörperklasse und für das Wirtstier, in dem der Antikörper erzeugt wurde. Diese Tatsachen kommen bei der Immunhistochemie zur Anwendung, indem der Primärantikörper über das Fab-Fragment an das darzustellende Antigen bindet. Der Sekundärantikörper ist gegen das Fc-Stück des Primärantikörpers gerichtet und markiert diesen spezifisch.

All diese Arbeitsschritte wurden in Pufferlösungen durchgeführt, die den physiologischen pH von 7,4 konstant hielten.

Nach Fixation der Zellen für 20 Minuten in 4% PFA, in 0,1 M PBS, wurden die Zellen viermal mit TBS gewaschen. Daraufgehend wurden die Zellen mit Triton X-100 0,25% (Triton in 0,5 M TBS) bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Triton X-100 als Detergens permeabilisiert die Zellmembran für große Moleküle wie Antikörper. Das ist wichtig, um intrazelluläre Antigene zu markieren. Nach Absaugen des Tritons und nach drei Waschvorgängen mit TBS, die jeweils 10 Minuten dauerten, wurde für eine Stunde 5% BSA-Lösung bei Raumtemperatur appliziert.

Dieser Vorgang sollte in dem Gewebe ein Milieu schaffen, das den Bedingungen im Serum möglichst ähnlich ist, damit der Antikörper unter physiologischen Konditionen in das Gewebe diffundieren kann.

Im nächsten Schritt wurde der Primärantikörper, in 0,8% BSA (BSA in 0,05 M TBS) gelöst, auf die Zellen gegeben. Dieser konnte entweder für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C auf den Zellen verbleiben. Bei der Inkubation über Nacht sollte die Kühlung die Reaktionsgeschwindigkeit senken, was unspezifische Bindungen verhindern sollte. Darauf folgte ein gründlicher, viermaliger Waschschrift innerhalb von 40 Minuten. Hierbei sollten alle Primärantikörper, die bis dahin noch nicht gebunden hatten, von den Zellen entfernt werden. Eine 60 minütige Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper schloß sich an. Der sekundäre Antikörper war gegen das Fc-Stück des Primärantikörpers gerichtet. Essentiell ist in diesem Fall, daß der Sekundärantikörper gegen die Spezies gerichtet ist, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde. Hier existieren zwei Möglichkeiten:

1. verwendet wird ein Sekundärantikörper, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist
2. verwendet wird ein Sekundärantikörper, der an das Molekül Biotin gebunden ist.

Wird nach der ersten Methode vorgegangen, dann ist die Markierung beendet und das Ergebnis kann mit einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Bei der zweiten Methode muß ein Fluoreszenzmarker oder ein Enzym zugefügt werden, der an das Biotin bindet und die Entwicklungsreaktion katalysiert.

Bei den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern wurde zusätzlich noch eine Kernfärbung mit Hoechst Dye, im Verhältnis 1:1000 gelöst in TBS, durchgeführt. Durch die Applikation von Bisbenzimid Hoechst Dye 33342, das in A - T - reiche Regionen doppelsträngiger DNA interkaliert, werden die Zellkerne markiert. Hoechst Dye 33342 kann die Zellmembran vitaler Zellen durchqueren (Sasaki et al. 1987).

Die Zellen wurden mit Poly-Aqua-Mount auf einem Objektträger eingedeckt, dabei wurde das Deckglasplättchen mit der Zellseite nach unten gelegt.

Als Beispiel für die immunhistochemische Färbung wird ein Standardprotokoll angegeben:

TBS: Tris-HCl gepufferte Saline

Dieser Puffer wurde direkt in einer 0,05 M Gebrauchslösung zubereitet:

6,057 g Tris (Trishydroxymethylmethylaminomethan)

8,766 g NaCl

ad 200 ml aqua dest.

pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf 7,6 einstellen (ca. 100 ml)

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Vorbehandlung:

Nach dem Waschen mit TBS:

10 min in Triton 0,25% bei RT

zweimal 10 min mit TBS 0,05 M waschen

60 min mit 5% BSA bei RT (45 min)

nicht waschen!

Primärantikörper:

60 min bei RT oder über Nacht bei 4° C Inkubation mit dem 1. Antikörper in 0,8% BSA

viermal 10 min Waschen in TBS

Sekundärantikörper:

60 min Inkubation mit 2. Antikörper (goat anti mouse 1:1000 / rabbit 1:2000)

dreimal waschen mit TBS

Färbung:

Hoechst Dye 1:1000 für 10 min bei 37° C

dreimal waschen TBS

Eindecken:

Poly-Aqua-Mount



### 2.17.2. Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Spezies	Eingesetzte Verdünnung
Anti- Integrin $\beta 1$	BD Biosciences	Monoclonal Maus	1 : 100
Anti- Aggrecan	Acris	Monoclonal Maus	1 : 200
Anti- Kollagen IV	Dako	Monoclonal Maus	1 : 100
Anti- Ki67	Abcam	Polyclonal Kaninchen	1 : 250
Anti- Fibronectin	Sigma	Monoclonal Maus	1 : 500
Anti- THY 1	Hybridomaüberstand	Polyclonal Kaninchen	1 : 10
Anti- CD 90	BD Biosciences	Polyclonal Kaninchen	1 : 800
Anti- Perlecan	MPI Martinsried	Monoclonal Maus	1 : 200

**Tabelle 4 : Primäre Antikörper der Immunhistochemie**

### 2.17.3. Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundärer Fluoreszenzantikörper	Verdünnung
Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppelt goat anti- Maus IgG; Amerham	1 : 1000
Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppelt goat anti- Kaninchen IgG (H + L); Jackson Immuno Research	1 : 2000

**Tabelle 5 : Sekundäre Antikörper der Immunhistochemie**

### 2.18. BrDU- Markierung

Um eine Aussage über die Proliferation der eMSC treffen zu können, wurden sie 24 Stunden vor der Fixierung mit 4% Paraformaldehyd bei 37° C mit dem Thymidin-Analogen BrDU (5-Bromo-2-Desoxy-Uridin) inkubiert, das statt Thymidin bei der DNS-Replikation eingebaut wird.

### 2.18.1. BrDU-Labeling in-vitro

#### 1. Tag

- Die Zellen wurden auf einem Deckgläschen kultiviert; 25.000 Zellen / Well.

#### 2. Tag

- Der Zellrasen wird mit BrDU, in einer Arbeitskonzentration von 10  $\mu$ M (Stocklösung [10 mM] 1 :1000 verd.), beschichtet:
- Pro Well werden 500  $\mu$ l Medium mit 0,5  $\mu$ l Stocklösung auf die Zellen pipettiert.

#### 3. Tag

- Das BrDU-Medium wird abgesaugt, anschließend wird die Schale zweimal kurz mit TBS 0,1% gespült.
- Eine 15minütige Fixierung mit 4% PFA schließt sich an.
- Darauf folgt ein erneuter Waschschrift, 4 x 5 min, mit TBS.
- Zur Demaskierung der Antigene erfolgt eine 45minütige Praeinkubation mit 1 M HCl bei 37° C.
- Es wird erneut dreimal 10 min mit TBS gewaschen.
- Eine 10minütige Inkubation mit Triton (0,59 g Ammoniumchlorid 0,5 M + 50 ml Triton X + 20 ml TBS), schließt sich dem Waschen und der Praeinkubation an.
- Im Anschluß daran wird zweimal 10 min mit TBS gewaschen, um sämtliche Tritonreste von der Probe zu eliminieren.
- Die Probe wird nun auf die Konfrontation mit dem Primärantikörper vorbereitet, indem 5% BSA (5 g in 100 ml TBS) für 60 min auf die Zellen appliziert wird.

Im nächsten Schritt wird der Primärantikörper, Anti - BrdU (monoclonal mouse) in einer Arbeitskonzentration von 2  $\mu$ l / ml (( $\rightarrow$  20  $\mu$ l AK + 980  $\mu$ l 0,8 % BSA)(0,8% BSA: 0,8 g in 100 ml TBS)), über Nacht bei +4° C oder 1 h bei Raumtemperatur inkubieren gelassen

#### 4. Tag

- Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wird das Medium abgesaugt.
- Ein erneuter Waschschrift, viermal 10 min mit TBS, schließt sich an.
- Nun erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 60 min.

- Für MSC bietet sich die Fluoreszenzentwicklung mit Goat-anti-mouse cy-2 (1:100 in TBS) an. Dafür wird nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper erneut viermal 10 min mit TBS gewaschen.
- Eine Kernfärbung mit Höchst dye (1:1000 in TBS), für 10 min bei 37° C erfolgt abschließend.
- Vor dem Eindecken in Poly-Aqua-Mount wird 3 x 10 min mit TBS gewaschen.

## **2.19. Transfektion der Zellen mittels eines adenoviralen Vektors**

Ein adenoviraler Vektor der dritten Generation, der von Prof. Kochanek (Sektion für Gentherapie der Universität Ulm) zur Verfügung gestellt wurde, fand hier Verwendung. Hierbei handelte es sich um einen high-capacity adenoviral vector HC-AdFK7, der das enhanced green fluorescent protein (EGFP) exprimiert. Anhand der grünen Fluoreszenz der Zellen, konnte detektiert werden, in welchen Zellen die Vektorsequenz inseriert wurde.

Dafür wurden die Zellen 48 Stunden vor der Fixierung mit einer Vektorstammlösung, die eine Konzentration von dreimal  $10^6$  infektiöser Einheiten pro  $\mu\text{l}$  enthielt, das entspricht ca. 50 MOI (multiplicities of infection / Viruspartikel) pro Einzelzelle, inkubiert. Nach Fixation und Einbettung wurde die Transduktionseffizienz bestimmt. Dazu wurden alle Zellen gezählt, die im Fluoreszenzmikroskop eine positive GFP-Expression aufwiesen und ins Verhältnis der Gesamtpopulation gesetzt. Diese wurde durch eine Hoechst Dye-Kernfärbung ermittelt. Zur Auswertung wurde das Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot / Zeiss) verwendet.

## **2.20. Austestung von verschiedenen Trägermaterialien**

### **2.20.1. Kollagen I Matrix als dreidimensionales Gel**

Zum Test der Zellen auf Verträglichkeit mit verschiedenen Trägermaterialien wurde zunächst ein Kollagen I Gel, aus Rattenschwanzkollagen (Firma Roche, Mannheim), ausgewählt. Dazu wurden die Zellen von der Schale abgelöst und anschließend in

das zuvor hergestellte Kollagen-Gel pipettiert und mit diesem resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in dem noch flüssigen Gel zu erreichen. Die Gel-Zell-Suspension wurde in eine 35 mm Falconschale pipettiert, diese wurde anschließend für 30 Minuten zum Aushärten des Gels bei 37° C in den Brutschrank gestellt. Nach den 30 Minuten war das Gel fest und es konnte Kultivierungsmedium auf die Gelmatrix gegeben werden.

Kollagen I Matrix (1 ml): (Yang et al. 1999)

200 µl 10x M-199

55 µl Aqua dest.

20 µl Glutamin

125 µl NaOH 0,1 mol / l

100 µl Natriumbicarbonat 200 mmol / l

500 µl Collagen (rat tail)

### **2.20.2. Kultivierung auf Microcarriern**

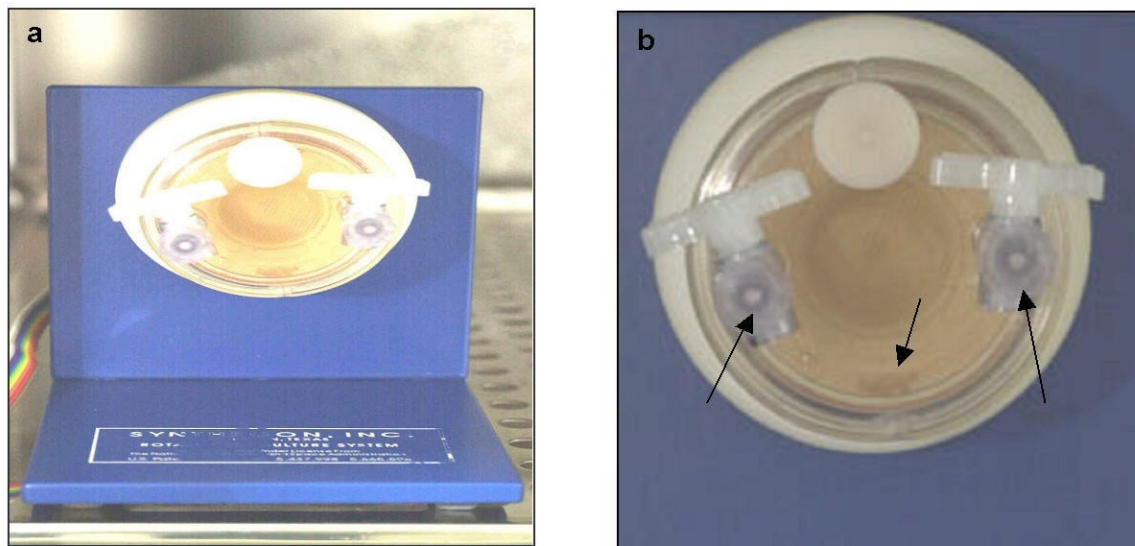
Im folgenden Versuch wurden Cultisphere S Microcarrier der Firma Percell Biolytica (Astorp / Schweden) verwendet.

Dazu wurden 1 mg der Microcarrier, in Aqua dest. gequollen und autoklaviert. Von diesen in Aqua dest befindlichen Microcarriern, wurden 100 µl auf 1 Million Zellen pipettiert. Das Aqua dest. wurde durch das Basalmedium aus den Microcarriern eliminiert. Eine 100 mm Falconschale wurde mit Polyheme (Sigma / Deisenhofen) beschichtet. Polyheme verhindert, daß die Zellen auf der Plastikoberfläche der Schale adhaerent werden. Dazu wurde 20 ml Kultivierungsmedium 1 in die Schale pipettiert, so daß die Microcarrier in Suspensionskultur mit den Zellen konfrontiert werden konnten. Danach wurden die Microcarrier zusammen mit einer Million eMSC in diese Schale gegeben. Die Adhärenz der Zellen auf den Microcarriern wurde sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch untersucht. Das Medium wurde, wie bei der Expansionskultur der Zellen, zweimal wöchentlich gewechselt.

### 2.20.3. Kultivierung der eMSC auf Microcarriern in einer Rotationskultur im osteogenen Medium

Für eine verbesserte Zell-Matrix-Interaktion wurden ebenfalls Microcarrier der Firma Percell verwendet. Diese Microcarrier wurden wie oben beschrieben zu den Zellen gegeben, doch diesmal wurde dieses Zell-Microcarrier-Gemisch nicht in einer statischen Kultur ausplattiert sondern in einer Rotationskultur (Synthicon, Houston/Texas) kultiviert. In dieser Kultivierungsform konnten die Zellen aufgrund der ständigen Rotation nicht adhaerent und von allen Seiten ernährt werden. Die Rotationskultur, imitiert damit gewissermaßen die Schwerelosigkeit. Die Zellen besiedelten, wie bereits beschrieben, erneut die Microcarrier. Das Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden, war ein osteogenes Medium, das dazu verwendet wurde, eine komplexe Zell-Microcarrier-Verbindung kalzifizieren zu lassen. Diese komplexe Verbindung soll für eine spätere Implantation in einen Knochendefekt genutzt werden können. Das Trägermaterial garantiert eine Ernährung der Zellen bis in den zentralen Bereich, somit kann eine Ischämie der Zellen ausgeschlossen werden. Auch bei diesem Ansatz wurde das Medium, wie bei der osteogenen Differenzierung im Monolayer, alle zwei Tage gewechselt, indem das alte Medium, unter Verschonung der Zell-Microcarrier-Komplexe, mit einer 10 ml Spritze aus dem Rotationssystem entnommen wurde. Anschließend wurden erneut 10 ml des Mediums in dieses System appliziert. Es mußte darauf geachtet werden daß in dem System keine Luftblasen verblieben, die unter Umständen eine Verwirblung hätten induzieren können. Nach Ablauf von drei Wochen wurden diese Zellen, adhärent auf den Microcarriern, mit dem Medium aus dem System entfernt und in einem Eppendorfröhrchen gesammelt. Nach dem Absinken wurde das Medium von dem Zell-Microcarrier-Gemisch abgesaugt und die Zellen mit 4% PFA, wie oben beschrieben, fixiert. Anschließend erfolgte eine Einbettung im Eppendorfröhrchen unter Zugabe von Tissue Tec und ein Einfrieren der auf den Microcarriern befindlichen Zellen bei -80° C.

Schließlich wurden die eingebetteten Zellen in einem Kryostaten geschnitten, die Schnittdicke betrug 7 µm. Die einzelnen Schnitte wurden auf einen Objektträger gezogen und mit einer Van-Kossa-Färbung, zum morphologischen Kalknachweis, gefärbt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.



**Abb. 6 : Rotationskultur**

- a) Übersicht Cell Rotary System (Synthicon / Houston Texas)  
 b) Konglomerat aus mit Zellen besiedelten Microcarriern-> mittlerer Pfeil  
 Luer Lock zum Einfüllen der Medien-> rechter und linker Pfeil

#### 2.20.4. Fibrinbeads als Trägermaterial

Die Herstellung der Fibrinbeads wurde mit Hilfe des Fibrinklebers Tissucol Duo der Firma Baxter (Mannheim) durchgeführt.

Dieser Fibrinkleber wurde mit Alginate und 5 IU Thrombin, zuzüglich des Ansatzes III verwendet (siehe S. 42).

Als Beispiel dient das folgende Protokoll zur Herstellung der Beads:

Verwendete Zellzahl: 1.250.000 eMSC

Beads: 20 Stück

Zellzahl pro Bead: 62.500

Es wurden in ein Eppendorfgefäß folgende Substanzen pipettiert:

25 µl	Alginate
20 µl	Ansatz III
150 µl	Fibrinogen
1.250.000	Zellen

Zuvor wurde eine 100 mm Falconschale mit Polyheme beschichtet.

Auf diese Schale wurden

20 ml            Ansatz IV

2 ml             $\text{CaCl}_2$  Ansatz 20 mM (dem vorher 0,5 ml Thrombin zugefügt wurde)  
vorgelegt.

Danach wurden aus dem Eppendorfröhrchen Tropfen, mit einem Volumen von 6  $\mu\text{l}$  mit einer Eppendorfpipette, in das  $\text{CaCl}_2$ -Gemisch pipettiert. Hierbei mußte auf die Polymerisation der Beads geachtet werden.

Zur vollständigen Auspolymerisierung wurden die Beads 20 Minuten bei Raumtemperatur in Ruhe stengelassen. Nach diesen 20 Minuten wurden sie mit Puffer I (s.u.) gespült und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Ein zweites Mal wurden sie mit Puffer I gespült. Der Puffer wurde abgesaugt und mit Puffer II bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Puffer II (s.u.) wurde abgesaugt und die Beads wurden mit Medium gewaschen.

In einer vorab mit Polyheme beschichteten 100 mm Falconschale wurden 20 ml Kultivierungsmedium I vorgelegt, das mit 250  $\mu\text{l}$  Trasylol (Bayer / Leverkusen) versetzt worden war. Trasylol wirkt einer Auflösung der Kügelchen entgegen, da sich der Fibrinkleber ansonsten innerhalb von zwei bis drei Wochen auflösen würde und damit die Trägersubstanz für die Zellen verschwunden wäre.

Die Kügelchen wurden mit den Zellen in der Kulturschale inkubiert und ein Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Pufferlösungen zur Herstellung der Fibrinbeads:

Puffer I:

NaCl	(MG: 58,44 g / mol)
KCl	(MG: 74,56 g / mol)
Hepes	(MG: 198,17 g / mol)
Glucose	(MG: 198,17 g / mol)
EDTA	0,02%

Puffer II:

Natrium-Citrat	(MG: 294,1 g / mol)
NaCl	(MG: 58,44 g / mol) pH 6,8
EDTA	(MG: 372,24 g / mol)

Ansatz III:

20 µl Zell-Suspension 1.250.000 Zellen in „Bead-Puffer“:

140 mM NaCl  
5 mM KCl  
10 mM Hepes  
10 mM Glucose  
0,02% EDTA

Ansatz IV:

102 mM CaCl<sub>2</sub> (MG: 147,02 g / mol)

## 2.21. Einbetten für die Histologie, sowie für Semi- und Ultradünnschnitte

### 2.21.1. Paraffineinbettung für das Autotechnicon für Stücke bis zur Dicke von 4 mm

Nach der PFA-Fixierung wurden die Zellpellets aus der chondrogenen Differenzierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Alkohol 75% I und II	jeweils für 1 Stunde
Alkohol 96% I	für 1 Stunde
Alkohol 96% II	für 1,5 Stunden
Isopropylalkohol 100% I und II	jeweils für 1,5 Stunden
Xylol I und II	jeweils für 1 Stunde

Anschließend erfolgte die Paraffineinbettung in zwei Schritten.

Paraffin I	für 1 Stunde
Paraffin II	mindestens 3 Stunden bis 24 Stunden



(Die Bezeichnung I und II bedeutet das Wechseln in frischen Alkohol, Xylol oder Paraffin.)

### 2.21.2. Einbetten für Semi- und Ultradünnschnitte

Nach der Fixierung wurden die Zellen mit den jeweiligen Trägermaterialien für 5 Minuten in 0,07 M Cacodylat-Puffer eingelegt. Anschließend wurden die Proben in einer 2% Osmium-Lösung (in 0,07 M Cacodylat-Puffer) für zwei Stunden bei 4° C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit sollten sich die Proben schwarz verfärbt haben. Es wurde einmal für 10 min in 0,07 M Cacodylat-Puffer gewaschen und danach noch zweimal in 0,05 M Maleatpuffer. In diesem wurden die Proben über Nacht bei 4° C aufbewahrt. Der Maleatpuffer sorgte für einen besseren Zellerhalt. Am nächsten Tag wurde die Probe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Reihenfolge war 30%, 50%, 70%, 90%, dreimal 100% für jeweils 10 Minuten bei 4° C. Während der nächsten 10 Minuten wurde ein Gemisch aus 100% EtOH und Propylenoxyd im Verhältnis 1:1 auf die Proben gegeben, danach folgten 10 Minuten in reinem Propylenoxyd. Die Proben wurden bei 4° C zwischengelagert. Die weiteren Schritte der Eponeinbettung erfolgten bei Inkubationszeiten von einer Stunde. In der ersten Stunde wurde eine Lösung aus Propylenoxyd und Epon im Verhältnis von 1:1 verwendet, in der zweiten Stunde wurde eine Lösung Propylenoxyd und Epon im Verhältnis von 1:3 auf die Proben gegeben. Anschließend wurde reines Epon über Nacht auf die Proben gegeben.

Am darauf folgenden Tag wurden Beem-Kapseln (Gelatinekapseln) mit Epon befüllt und die Proben wurden in die konisch zulaufenden Spitzen der Beem-Kapseln appliziert. Eine Aushärtung des Kunststoffes erfolgte im Wärmeschrank bei 60° C. Die Aushärtezeit bei den Microcarriern betrug 2,5 Tage und bei den Fibrinbeads 3 Tage. Nach dem Abkühlen konnten die in Kunststoff eingebetteten Proben geschnitten werden.

Rezept zur Herstellung von 25 g Epon:

Epikot	11,56 g
Dodecanylbernsteinsäureanhydrid (DDSA)	7,13 g
Methylnodicanhydrid (MNA)	6,28 g
2,4,6-Triphenol (MMP-30)	0,38 g

## 2.22. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 2.22.1. RNA Isolierung

Die behandelten Proben stammten aus einer chondrogenen Differenzierung, die sowohl an nativen als auch an kryoprotektierten Zellen stattgefunden hatte. Die Inkubation erfolgte in einem 15 ml Falconröhrchen in Form einer 3D-Kultivierung im Pellet von 300.000 Zellen, die sowohl in chondrogenem Medium, als auch ohne Differenzierungsmedium mit Hilfe der RT-PCR analysiert wurden.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den eMSC wurde das peqGOLD TriFast der Firma peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) verwendet.

#### Vorbereitung der Zellen

Das Medium wurde von den Zellpellets abgesaugt und es wurde zum Ablösen der Zellen Accutase appliziert. Mit einer Pipettenspitze wurde das Pellet durch häufiges und heftiges Resuspendieren mechanisch zerkleinert. Nach erfolgter Homogenisierung wurde die Accutase nach einer Zentrifugationszeit von 5 min bei 800 rpm abgesaugt. Das Pellet wurde zur weiteren Behandlung in ein Eppendorfröhrchen überführt. In diesem Zustand konnten die Proben bei -80° C gelagert werden.

Die weitere RNA-Gewinnung und -Aufreinigung erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma peqLab (Erlangen) für peqGOLD TriFast, die im folgenden zusammengefasst wird.

Suspension bzw. eingefrorenes Pellet in 1 ml TriFast lysieren.

Wenn nötig, mit Spritze und Kanüle (20 G) homogenisieren und 5 min bei RT = Raumtemperatur ruhen lassen. Nach der Ruhephase wurden 200 µl Chloroform pro 1 ml TriFast dazugeben und kräftig geschüttelt (per Hand, ca. 15 sec.). Danach wurde die Probe erneut ruhengelassen und zwar für 3-10 min bei RT (5 min). Der Inkubation schloß sich die Zentrifugation der Probe bei 12000 g, 5 min, RT an. Danach sollten drei Phasen: unten (rot): Phenol-Chloroform (DNA, Proteine), **oben (farblos): wässrige Phase: RNA**, dazwischen: Interphase (DNA, Proteine) deutlich sichtbar sein. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen (hierin befand sich die RNA). Diese wurde in ein neues Tube überführt, hier wurden 500 µl Isopropanol pro

1 ml TriFast vorgelegt. Zum Vermischen der Probe mit dem Isopropanol wurde kräftig geschüttelt. Eine erneute Inkubationszeit von 5-15 min (10 min) bei RT schloß sich an. In dieser Zeit wurde die Zentrifuge auf 4° C gekühlt. Die Probe wurde in diesem Schritt bei 12000 g, für 10 min und bei 4° C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren sollte ein Pellet sichtbar sein. Der Überstand wurde vorsichtig vom Pellet abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das Pellet zweimal gewaschen, jeweils mit 1 ml EtOH (75%) pro 1 ml TriFast. Dazu wurde EtOH auf das Pellet gegeben und gevortext, danach erneut zentrifugiert, bei 12000 g für 10 min und bei 4° C. Nach dem Waschschrift wurde das Ethanol von dem Pellet abgenommen und die RNA wurde bei RT trockengelassen. Anschließend konnte die Probe in 10 µl DEPC-Wasser (RNase und DNase freies Wasser) aufgenommen werden und bei -80° C gelagert werden.

#### **2.22.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 250 nm. Bei dieser Wellenlänge haben Nukleinsäuren in Lösung ihr Absorptionsmaximum. Die Konzentration der Lösung ist proportional zur gemessenen Extinktion und kann unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung berechnet werden, eine Extinktion von 1,0 entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

#### **2.22.3. DNase Verdau**

DNase I ist ein Enzym, das in der Lage ist, einzel- und doppelsträngige DNA abzubauen, ohne die während der Reaktion vorhandene RNA zu schädigen. Zur Beseitigung von möglichen DNA-Kontaminationen in der isolierten Gesamt-RNA wurde daher ein DNase-Verdau durchgeführt. Nach dem Protokoll von Invitrogen wurden 2 µl Gesamt-RNA in 1x DNase I-Puffer mit 2 U DNase I (Invitrogen) für 15 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden anschließend 2 ml EDTA (25 mM) zugesetzt. Die RNA konnte dann direkt in die Reverse Transkriptions- (RT-) Reaktion eingesetzt werden.

Nach der Isolierung von Gesamt-RNA aus den differenzierten als auch undifferenzierten eMSC's, war es teilweise wegen der geringen Ausbeute nicht

möglich, die Konzentration der Gesamt-RNA zu bestimmen. Dann wurde die gesamte isolierte RNA komplett in den DNase-Verdau und die anschließende reverse Transkription eingesetzt.

#### 2.22.4. Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird aus RNA cDNA synthetisiert, die anschließend als Template für PCR's dienen soll. Die 2 µg mit DNase I verdaute Gesamt-RNA wurde zur Aufhebung von Sekundärstrukturen zunächst in einen Thermocycler (Primus 96<sup>plus</sup> MWG AG Biotech / Ebersberg) für 10 min bei 65° C denaturiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe des RT-Mixes erfolgte innerhalb einer Stunde die Synthese des komplementären DNA-Stranges durch das Enzym „Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase“ (M-MLV RT) (Invitrogen) bei 37° C im Thermocycler. Als Primer wurden Oligo-dt16-Primer (MWG) verwendet. Zur Inaktivierung des Enzyms und zur Denaturierung des RNA / DNA-Doppelstranges wurde der RT-Ansatz anschließend für 5 min bei 90° C erhitzt. Die erhaltene cDNA konnte dann sofort in die verschiedenen PCR-Experimente eingesetzt werden.

Zusammensetzung des RT-Mixes:

2 µg	RNA
1x	First-Standard Buffer (5x) (Invitrogen)
10 mM	dNTP-Mix (Genecraft)
0,5 µg	Oligo dT16 (MWG)
0,1 M	DTT (Invitrogen)
200 U	M-MIV RT (Invitrogen)
ad 50 µl	RNase freies Wasser

#### 2.22.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) / RT-PCR

Zum Nachweis der Transkripte und zur relativen Quantifizierung der Expression unterschiedlicher Gene wurde die PCR in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Primus 96<sup>plus</sup> MWG AG Biotech) nach dem unten angegebenen Programm angewendet. 4 µl des RT-Ansatzes (s. RT Ansatz) wurden mit genspezifischen

Primern (Sequenzen siehe Tab. 7) in die PCR eingesetzt. In einem Reaktionsansatz wurden gleichzeitig das gewünschte Zielgen und ein konstitutiv exprimiertes Gen (housekeeping Gen), hier  $\beta$ -Actin, amplifiziert. Die Annealing-Temperatur wurde für jedes zielgenspezifische Primerpaar individuell verändert (Tab. 6). Nach der Amplifikation wurden die Transkripte mit DNA-Probenpuffer (fünfmal) versetzt, in einem 2% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid (Serva / Heidelberg) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Zielgen- Primer	Konzentration	Annealing- Temperatur	Zyklen
$\beta$ - Aktin –F/R	Je 25 pmol	54° C	34
Aggrecan –F/R	Je 25 pmol	54° C	34
Collagen-II –F/R	Je 25 pmol	58° C	34
PCR- Bedingungen und Primerkombinationen			

**Tabelle 6 : Polymerase-Kettenreaktion, Primer**

**PCR-Ansatz:**

4 $\mu$ l	RT-Ansatz (2 $\mu$ g RNA in RT-Reaktion eingesetzt)
1x	PCR-Puffer
10 mM	dNTP-Mix
je 2 pmol	antisense/sense genspezifischer Primer
je 2 pmol	antisense/sense $\beta$ -Actin Primer
2,5 U	Biotherm DNA-Polymerase (Genecraft / Ludinghausen)
ad 50 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

**PCR-Programm im Thermocycler:**

94° C	10 min
94° C	1 min
Annealing	45 sek
72° C	90 sek
72° C	10 min

DNA-Probenpuffer (fünfmal) :

25 mM Tris / HCl (pH 7,0)

150 mM EDTA

0,05% Bromphenolblau

25% Glycerin

Die folgenden Primerpaare wurden verwendet:

Bezeichnung	Strang	Sequenz (5'-3')	GenBank	Position	Fragment (bp)
eq- $\beta$ - Aktin- F	sense	ATC CAC GAA ACT ACC TTC AAC	AF035774	821- 841	174
eq- $\beta$ - Aktin- R	antisense	CGC AAT GAT CTT GAT CTT CAT C		973- 994	
eq- aggrecan- F	sense	ACA ACA ATG CCC AAG ACT AC	AF040637	110- 129	102
eq- aggrecan - R	antisense	GCC AGT TCT CAA ATT GCA AG		192- 201	
eq- coll- II- F	sense	TGA AAC TCT GCC ACC CTG AAT G	U62528	3762- 3782	175
eq- coll- II- R	antisense	TTG TCC TTG CTC TTG CTG CTC		3916- 3936	

**Tabelle 7 : Primersequenzen**

## 2.22.6. Elektrophoretische Auftrennung

Für die elektrophoretische Auftrennung, zur Visualisierung der PCR-Ergebnisse, mußte ein Agarose-Gel (2% Agarose, gelöst in einmal TBE) gegossen werden.

Nach Aushärtung des Gels wurden sowohl ein 100 bp Marker als auch die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer der Firma Bio Rad „Sub-Cell GT“, gefüllt mit einmal TBE, gegeben und bei einer Spannung von 90 V für 45 Minuten betrieben. Nach der Auftrennung konnte das Gel in einem Transilluminator der Firma Biometra „Bio Doc II“ (Göttingen) ausgewertet werden. In diesem werden die Banden, mit Hilfe von UV-Licht, sichtbar gemacht. Mit dem dazugehörigen Computerprogramm der Firma Biometra konnten die Banden aufgenommen werden.

## 2.23. Mikroskopie

### 2.23.1. Lichtmikroskopie

Die sich in Kultur befindenden Zellen wurden regelmäßig hinsichtlich ihrer Morphologie, sowie ihres Proliferations- und Differenzierungsverhaltens untersucht. Diese Untersuchungen wurden an einem Inversmikroskop, Axiovert 100 (Zeiss / Oberkochen) durchgeführt.

An diesem Mikroskop erfolgten auch Vitalbeobachtungen, die mit einer Digitalkamera (Leica / Wetzlar) aufgenommen und mit der Software Leica DFC (Version 6) visualisiert wurden.

Von den in Epon eingebetteten zellbeladenen Fibrinbeads und Microcarriern wurden, mit Hilfe von Glasmessern, an einem Reichert Ultracut R Mikrotom (Leica Mikrosystem / Wetzlar), 500 nm dicke Semidünnschnitte angefertigt, die anschließend auf Glasobjektträger aufgezogen wurden. Anschließend wurde auf einer Heizplatte mit einer kurzen Reaktionszeit an den Schnitten eine Methylenblaufärbung durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung fand mit Hilfe eines Lichtmikrokopes (Zeiss Axiophot) statt.

Die densitometrische Auswertung der osteogenen Differenzierung, der die NBT-Färbung als Nachweis zugrunde lag, wurde an einem Mikroskop der Firma Olympus ausgeführt. Zur Bildanalyse der densitometrischen Werte wurde mit dem Bildanalyseprogramm Optimas der Firma Optimas select (Seattle / USA) gearbeitet. Dazu wurden verschiedene Grauwerte ermittelt (Densitometric units). An den Schwarzweißaufnahmen wurde ein Weißabgleich vorgenommen und der Grauwert auf 220 festgelegt. Dieser Wert (als Referenzwert für den Hintergrund) wurde als Nullwert angesehen und die weiter ermittelten Werte daran abgeglichen. Da 220 als Nullwert festgelegt war, wurde von gemessenen Grauwerten immer der Hintergrund (220) abgezogen.

### **2.23.2. Fluoreszenzmikroskopie**

Die immunhistochemisch hergestellten Präparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss), unter Verwendung von spezifischen Fluoreszenzfiltern (AF) ausgewertet. Es wurde die Bildaufnahmesoftware Meta Vue (Visitron / München) verwendet.

### **2.23.3. Elektronenmikroskopie**

Für die Elektronenmikroskopie wurden von den in Epon eingebetteten (siehe 2.12.2), zellbeladenen Fibrinbeads und Microcarriern mit einem Diamantmesser an einem Ultramikrotom Ultracut (Reichert) R 60-70 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Die Eponschnitte wurden nach Kontrastierung auf Kupfergrits aufgezogen. Die Untersuchung der Schnitte fand mit Hilfe eines Zeiss EM 902A Elektronenmikroskopes statt.

### **2.24. Reimplantation der Zellen**

Die Reimplantation wurde an insgesamt 34 Pferden von der chirurgischen Veterinärklinik für Pferde der Justus-Liebig-Universität in Gießen (5 Pferde) und von der Tierarztpraxis Rohde in Wachtberg (29 Pferde) durchgeführt.

Die Zellen wurden nach dem Ablösen zentrifugiert und im Pellet auf Eis jeweils in die Klinik / Praxis transportiert.

Für jeden Patienten wurden zwei Eppendorfröhrchen mit jeweils 4 Millionen Zellen vorbereitet. Die Zellen befanden sich in einem Basalnährmedium mit Penicillin / Streptomycin. Dieses war abzusaugen und zu verwerfen.

Das Pferd wurde zur Reimplantation wieder mit Detomedin ca. 0,7 ml (10 mcg / kg KGW) sediert. Nach der Sedation wurde erneut Flüssigkeit aus dem Sternum gewonnen und mit den Zellen resuspendiert.

Das zu injizierende Volumen konnte auf den Bedarfsfall angepaßt werden, meist waren es 1 oder 2 ml. Es konnte wahlweise mit Knochenmarkflüssigkeit, Serum oder NaCl-Lösung resuspendiert werden.

Schließlich wurde mittels Sonographie der Defekt an der Gliedmaße aufgesucht und unter Ultraschallkontrolle die Zellsuspension mittels einer Spritze mit einer 20 G



Kanüle (Terumo / Eschborn) in den Defekt injiziert. Abschließend wurde ein Robert-Jones- oder Röhrenverband angelegt.

Der Trainingsplan für die Pferde umfaßte eine Boxenruhe von ca. 3-7 Tagen, mit einer anschließender Schrittphase von ca. 3 bis 5 Monaten, bis zur Abheilung des Defektes. Waren die Tiere nach der Schrittphase, bei geschlossenem Defekt, beim Vortraben lahmheitsfrei, konnten die Besitzer wieder mit leichter Trabarbeit beginnen, mit einer Trainingssteigerung von fünf Minuten wöchentlich. Eine Verlaufskontrolle, sowohl ultrasonographisch als auch palpatorisch und adspektorisch, erfolgt nach ca. 6 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten.

## **2.25. Bestimmung der Zellzahl und Generationsverdopplungszeit**

### **2.25.1. Zellzählung der kultivierten Zellen**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einem Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer). Entsprechend Punkt 2.6 wurde eine Zellsuspension hergestellt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Pellet wurde mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert und ein Tropfen dieser Zellsuspension in die Zählkammer gefüllt. Es folgte die Zählung und Addition der Zellen von 16 kleinen Eckquadraten (16 kleine Eckquadrate entsprechen einem Großquadrat) im Phasenkontrastmikroskop. Aus der errechneten Summe wurde der Mittelwert (MW) bestimmt. Die Zellzahl der Suspension konnte dann anhand folgender Formel ermittelt werden:

---

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{MW der Zellzahl aus 2 Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante } (10^4)$$

---

### **2.25.2. Berechnung der Generationsverdopplung**

Die Berechnung der Generationsverdopplungszeit findet sich unter Punkt 2.14.

### **2.25.3. Statistische Kalkulation des Signifikanzniveaus**

Für die statistische Kalkulation der Unterschiede wurde der T-Test zur Darstellung der Signifikanz herangezogen. Dieser wurde mit Microsoft Excel 9.0 unter Windows 2000 (Microsoft Corp., Redmond, USA) berechnet. Hierbei wurde das Signifikanzniveau bei  $p < 0,05$  definiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Kultivierung equiner mesenchymaler Stammzellen

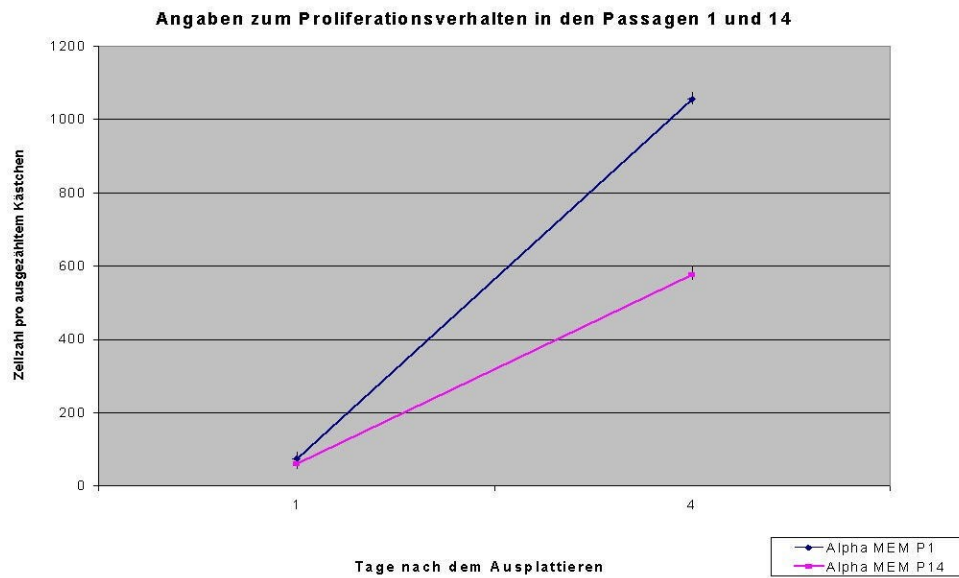
Equine mesenchymale Stammzellen (eMSC) können aus dem Sternalpunktat von Pferden isoliert und vereinzelt werden. Nachdem vereinzelt Zellen adhaerent geworden sind, beginnen sie zu proliferieren. Am zweiten Tag, nach dem Ausplattieren, können einzelne adhaerente Zellen auf dem Boden der Schale gefunden werden. Bereits eine Woche später sind einige Zellkolonien aufzufinden, die sich in dieser Zeit gebildet haben.

In der Kultur mit dem Standardmedium (Kultivierungsmedium 1) zeigen die Zellen eine typisch spindelförmige Morphologie, ein gutes Proliferationsverhalten sowie ein gleichmäßiges Wachstum mit spezifischer stromlinienförmiger Anordnung. Die Zellen wurden bereits 10 Tage nach dem ersten Ausplattieren passagiert. Danach erfolgten wöchentlich weitere Passagen, um die Zellen auszudünnen. Dabei konnte mit den Zellen eine maximale Passagenzahl von 14 erreicht werden.

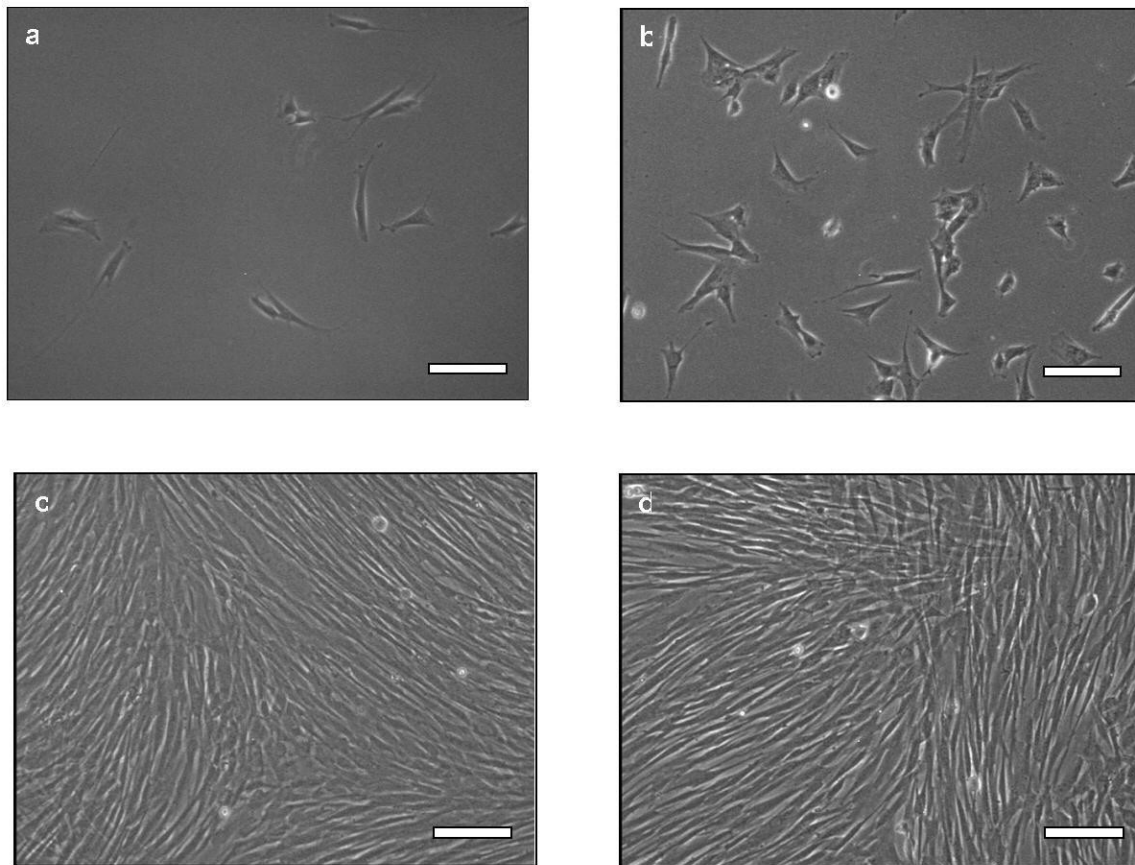
Die Zellen proliferieren und ordnen sich stromlinienförmig an, während sich die Zellkörper allmählich lang strecken. Morphologisch zeigen die Zellen anfangs ein kugelförmiges bis dreieckiges Aussehen, das sich zunehmend organisiert (Abb. 8 a-d). Die Proliferationsrate wurde durch Auszählung der Zellen in einer definierten Rasterschale bestimmt. Hier konnte am ersten Tag nach dem Ausplattieren der Zellen (Passage 1) in dem Kästchen 75 Zellen  $\pm 18,38\%$  gezählt werden. Am vierten Tag nach dem Ausplattieren wurden im gleichen Kästchen bereits 1055 Zellen  $\pm 12,72\%$  gezählt. Aufgrund der Schalendichte (Konfluenz ca 80%), mußte nach dem Auszählen passagiert werden, so daß kein weiterer Wert ermittelt werden konnte. Im Verlauf der einzelnen Passagen nimmt die Proliferationsrate langsam ab. In Passage 14 konnten dann, einen Tag nach dem Ausplattieren, noch 61  $\pm 20,5\%$  Zellen und am vierten Tag nach dem Plattieren noch 577 Zellen  $\pm 12,72\%$  gezählt werden ( $p < 0,001$ ) (Abb. 7) ( $n=5$ ).

In Passage 14 sind die Zellkörper nicht mehr scharf umrissen, sondern zeigen Zytoplasmaausstülpungen, die ihren Zellkörper nicht mehr schlank und langgestreckt aussehen lassen. Die Zellen nehmen zunehmend eine polymorphe Gestalt an. Diese

Zellen werden als matur bzw. differenziert bezeichnet. Diese Chargen wurden deshalb von weiteren Experimenten ausgeschlossen.



**Abb. 7 : Proliferationsverhalten in den Passagen 1 und 14 (n=5)**



**Abb. 8 : eMSC nach Isolation im Kultivierungsmedium 1 im zeitlichen Verlauf;**

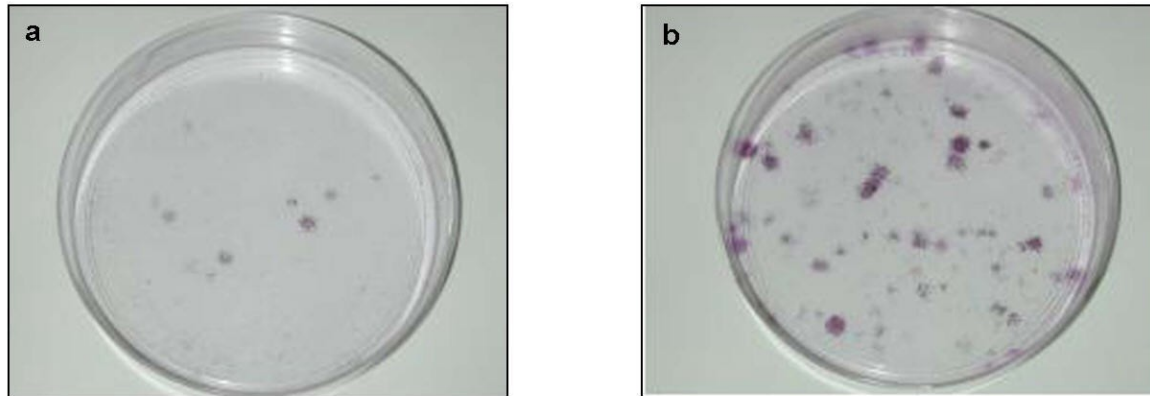
- a) Zellen einen Tag nach dem Ausplattieren
  - b) Am dritten Tag, nach dem Plattieren, hat die Zellzahl deutlich zugenommen
  - c) Fünf Tage nach dem Aussäen zeigen die Zellen eine stromlinienförmige Anordnung mit deutlich gestreckten Perikarya, Konfluenz von ca 80%
  - d) Nach sieben Tagen zeigte sich eine deutliche Überlappung der Zellen mit unterschiedlichen Ausrichtungen
- Balken entsprechen 90 µm

### 3.2. Colony forming units-fibroblast assay (CFU)

Zum Nachweis des selbsterneuernden Potentials des MSC und zur Veranschaulichung der Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl auf die Koloniebildung wurden definierte Zellzahlen in eine Schale appliziert und anschließend mit einem CFU ausgewertet ( $n = 3$ ). Die Kolonien geben einen Aufschluß über das Teilungsverhalten (Frequenz und Reinheit) der Zellen.

Diese Untersuchung hat ergeben, daß bereits eine Zellzahl von fünf eMSC ausreichend war, um ein Koloniewachstum von 2 Kolonien verzeichnen zu können. Bei dem Einsatz von 10 Zellen konnten 4 Kolonien, bei 100 Zellen 35 Kolonien, bei

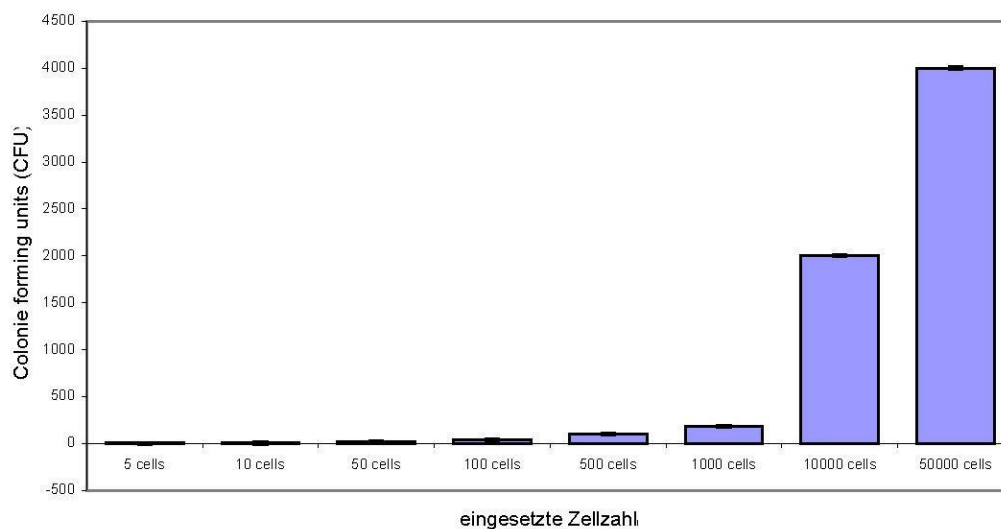
1000 Zellen bereits 180 Kolonien, bei 10.000 Zellen 2.000 Kolonien und bei dem Einsatz von 50.000 Zellen sogar 4.000 Kolonien verzeichnet werden (Abbildung 10). Die Kolonien konnten mittels Cresylviolettfärbung dargestellt werden.



**Abb. 9 : CFU-Assay: Koloniewachstum nach 14 tägiger Kultivierung (n = 3)**

- a) CFU mit einer Zellzahl von 50 Zellen / Schale, es bildeten sich 20 Kolonien  
b) CFU mit einer Zellzahl von 500 Zellen / Schale, es bildeten sich 100 Kolonien

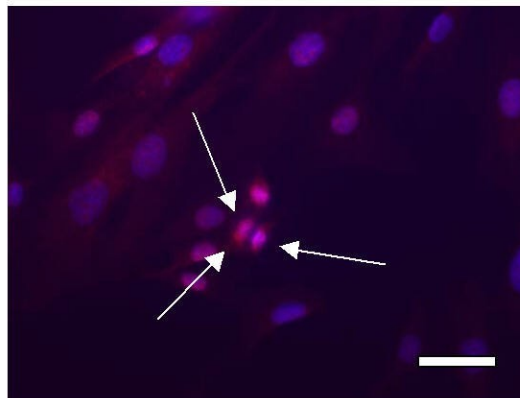
### CFU-F Assay



**Abb. 10 : CFU-F Assay (n = 3)**

### 3.3. Demonstrations des Teilungspotentials der Zellen mittels Ki 67

Mit Ki 67 wird das Teilungspotential der Zellen demonstriert. Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fixation in Teilung befanden und dann mit einem Antikörper, Anti-Ki 67, konfrontiert wurden, wurden durch die Antikörperbindung spezifisch markiert ( $n = 5$ ). Mit Ki 67 konnten nur die Zellen dargestellt werden, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in Teilung befanden. Deshalb konnte anhand dieser Färbung kein Rückschluß auf die Proliferationsrate gezogen werden. Um darüber einen Überblick zu bekommen, wurde die Teilungsrate mit Hilfe der BrDU-Markierung ermittelt. Der Unterschied zur Ki 67 besteht darin, daß bei Ki 67 nur der Moment der in Teilung befindlichen Zellen bei der Fixierung erfaßt wurde, hingegen bei der BrDU-Markierung die Zellteilung über einen Zeitraum von 24 Stunden beurteilt werden kann. Deshalb wurde im weiteren noch eine BrDU-Markierung der Zellen durchgeführt.



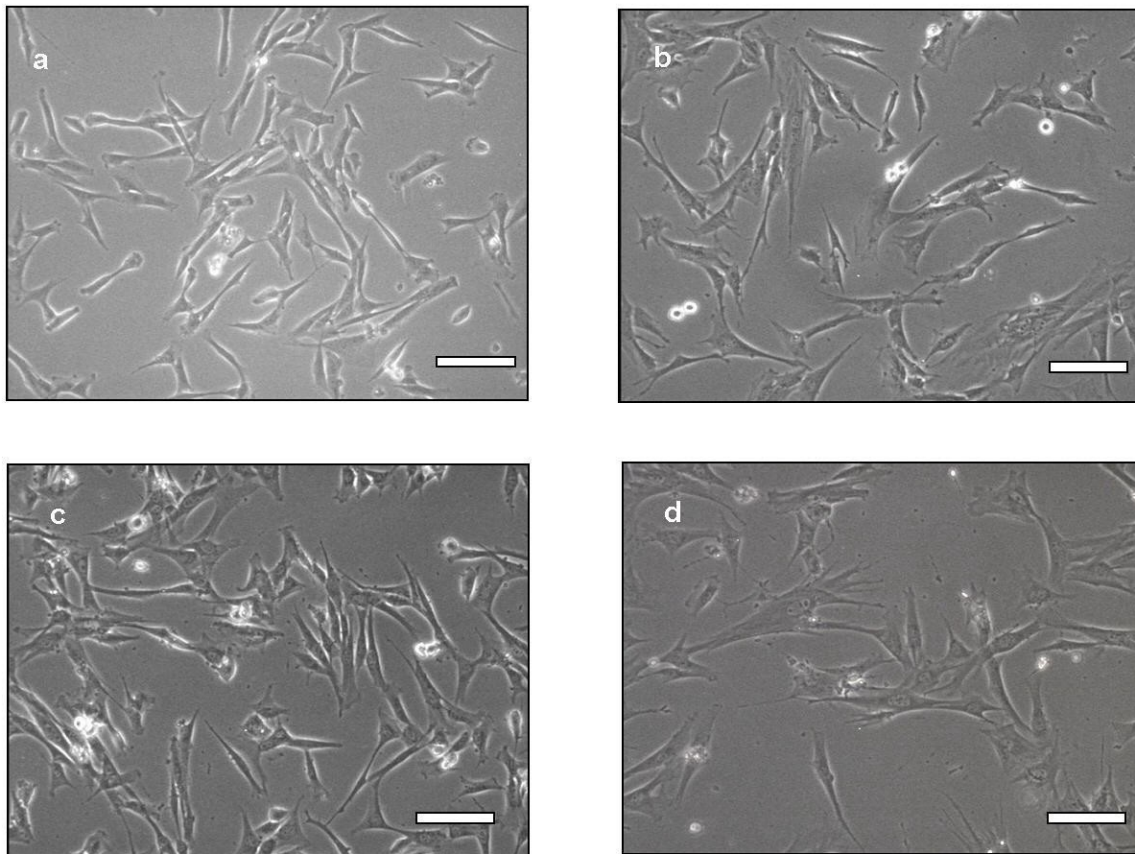
**Abb. 11 : Visualisierung des Zellteilungspotentials mittels Ki 67**

Die Pfeile deuten auf die sich in Teilung befindlichen Zellen  
Balken entspricht 30  $\mu\text{m}$  ( $n = 5$ )



### 3.4. Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff

Um zu untersuchen, ob eine Kryokonservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff möglich ist, und ob sich diese problemlos einfrieren und auftauen lassen, wurde die Zellvitalität nach Kryokonservierung und Auftauen untersucht ( $n = 12$ ). Insbesondere war es das Ziel der Untersuchung, herauszufinden, ob durch eine Kryokonservierung die Zellen hinsichtlich ihres Proliferations- und Differenzierungsverhaltens Alterationen aufwiesen.



**Abb. 12 : Kryokonservierte und nicht-konservierte Zellen**

(a+b) Kryokonservierte Zellen, (a) Zellen in Passage 1+1, (b) Zellen in Passage 1+7  
(c+d) unkonservierte Zellen, (c) Zellen Passage 2, (d) Zellen in Passage 8  
Balken entsprechen 90  $\mu\text{m}$  ( $n = 12$ )

Die kryokonservierten Zellen zeigten gegenüber den nicht-kryokonservierten Zellen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Morphologie. Es sind weder in der frühen Passage P1+1 und P2, noch in einer hohen Passage P1+7 und P8 morphologische Abweichungen gegenüber den nicht-kryokonservierten Zellen zu erkennen. Die Zellen wiesen insgesamt eine spindel- oder fibroblastenähnliche Morphologie auf,



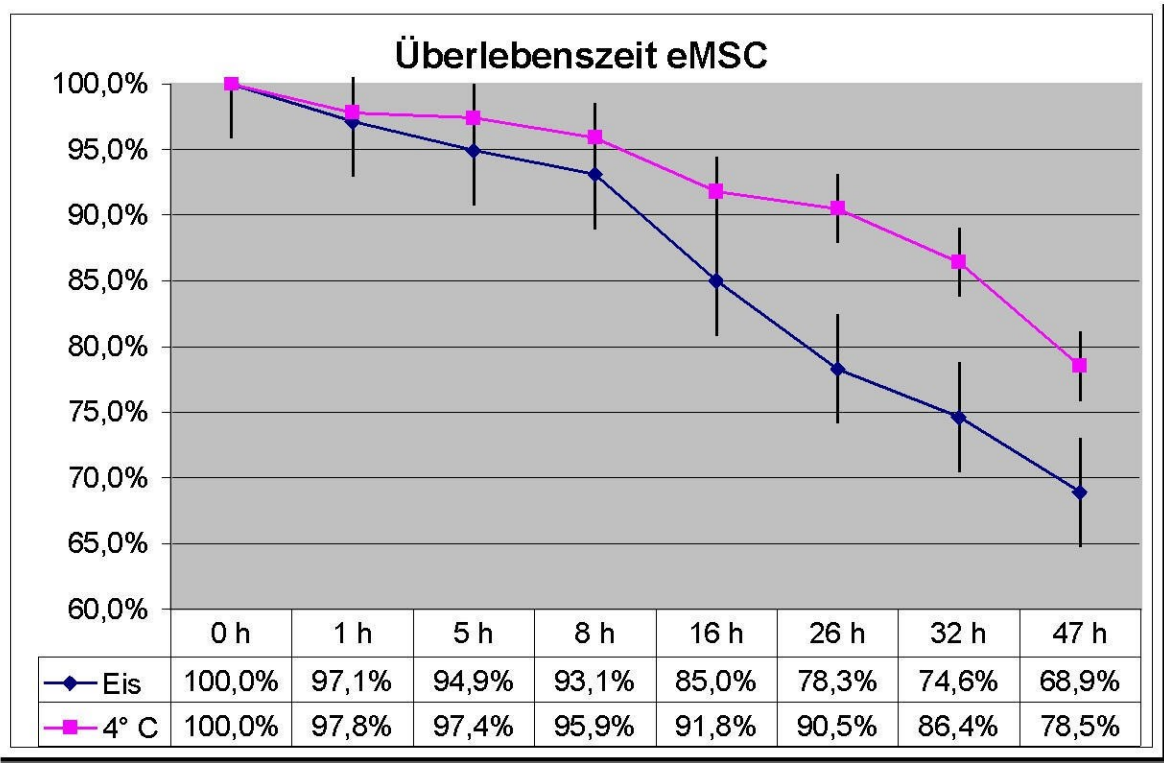
vereinzelt fanden sich in beiden Ansätzen mature Zellen, d.h. mehr polymorphe Phänotyp.

Nach dem Auftauen zeigten die Zellen immer noch das Bestreben Zell-Zell-Kontakte auszubilden, sowie die Tendenz, sich stromlinienförmig auszurichten.

Es waren keine Veränderungen der „älteren“ Zellen aus den höheren Passagen (P1+P7 und P8) gegenüber den „juvenilen“ Zellen aus den Passagen P1+1 und P2, erkennbar.

### 3.5. Untersuchung zur Vitalität der eMSC bei Lagerung auf Eis und bei +4° C

Für diese Untersuchung wurde eine Zellzahl von 1 Million Zellen pro 1 ml Medium eingesetzt (n = 6).



**Abb. 13 : Darstellung der Überlebenszeit der eMSC bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen (n = 6)**

Da für einen routinemäßigen Einsatz der Zellen z.T. lange Transportwege zurückgelegt werden müssen, war es, im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz der Zellen, Ziel dieser Teiluntersuchung, den Zellmetabolismus für diesen Zeitraum herabzusetzen.

Da das Herunterkühlen auf Raumtemperatur nicht ausreichend war (um die Stoffwechselaktivität ausreichend herabzusetzen), wurden die Zellen auf Eis transportiert und bis zur terminalen Implantation in das Empfängertier im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Aus diesem Grund mußte die Zahl überlebender Zellen ermittelt werden, die 24 bzw. 28 Stunden nach dem Ablösen von der Schale noch vorhanden waren.

Anhand der ermittelten Zahlen wurde die einzusetzende Zellzahl zur Implantation bestimmt.

Bevor die Zellen gekühlt wurden, mußten sie von der Kultivierungsschale abgelöst werden. Dies führte während des Ablösens zu einem Zellverlust von ca. 8%, der bei dieser Untersuchung berücksichtigt wurde.

Vor der Lagerung auf Eis oder bei +4° C wurde eine Ausgangszellzahl von 1 Million lebender Zellen pro Milliliter gewählt. Bei einer Lagerung der Zellen, bei 4° C (im Kühlschrank) und auf Eis, konnte nach 1 Stunde eine Verlustrate von 2,9% ± 2,7% auf Eis und von 2,2% ± 2,2% bei +4° C ermittelt werden. Dies entsprach 978.000 lebender Zellen auf Eis und 985.000 lebenden Zellen bei +4° C. Im weiteren Verlauf wurde beobachtet, daß nach 5 Stunden auf Eis 950.000 Zellen und bei +4° C 978.000 Zellen überlebten. Dies entsprach einem Verlust nach der ersten Stunde von 5,1% ± 3,5% auf Eis und 2,6% ± 1,9% bei +4° C. Ein deutlicher Zelltod konnte nach 16 Stunden ermittelt werden, dieser lag bei auf Eis gekühlten Zellen bei 870.000 lebenden Zellen und bei +4° C gekühlten Zellen bei 951.000 lebenden. Mit einer Verlustrate von 15% ± 8,4% (Eis) der Ausgangszellzahl bzw. von 8,2% ± 6,5%, (+4° C) stellte sich heraus, daß die Zellen bei einer Lagerungstemperatur von +4° C deutlich weniger Zellverluste erleiden, als es bei einer Lagerung auf Eis der Fall war. Trotz des Verlustes von 15% (Eis), nach einer Lagerung auf Eis von 16 Stunden, konnte nur ein vergleichbar geringer Prozentsatz an toten Zellen ermittelt werden. Diese Tendenz konnte bis zum Ende des Versuches weiter beobachtet werden. Selbst nach einer Lagerung von 47 Stunden überlebte, sowohl auf Eis als auch bei +4° C, eine hohe Anzahl von Zellen. Auf Eis wurden nach 47 Stunden 730.000 überlebende Zellen und bei +4° C noch 893.000 lebende Zellen gezählt. Dies

entsprach einer Verlustrate von  $31,1\% \pm 5,2\%$  der Zellen auf Eis und einer Verlustrate von  $21,5\% \pm 11,1\%$  bei  $+4^\circ \text{C}$ .

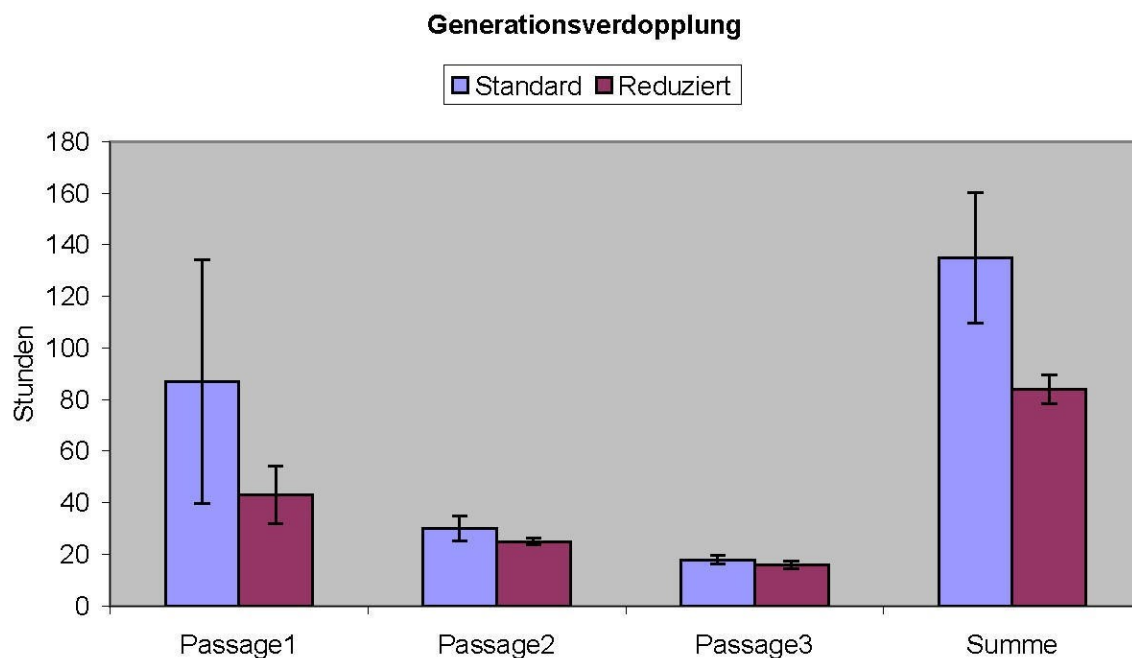
Beide Populationen wurden nach 47 Stunden unterschiedlicher Kühlung auf 60 mm Falconschalen ausplattiert. Die Kulturen wurden schnell adhaerent und proliferierten innerhalb eines Tages nach dem Ausplattieren. Die Zellen wiesen keine morphologischen Abweichungen auf (a+b kryokonservierte und c+d nicht-konservierte Zellen). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Überlebensrate bei den beiden Lagerungsarten der Zellen ( $p = 0,100$ ).

### **3.6. Untersuchung des Einflusses einer hypoxischen Stoffwechsellage auf das Proliferationsverhalten der eMSC's**

Da die MSCs zur Regeneration von bradytrophen Gewebe wie Knorpel und Sehne eingesetzt werden sollen, wurden die Zellen auch unter einer reduzierten Sauerstoffspannung kultiviert ( $n = 5$ ). Im Vergleich zu einem Sauerstoffgehalt von 21% (Normoxie), wurden sie auch unter hypoxischen Bedingungen bei 3% Sauerstoffgehalt kultiviert. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Zellzahl (Generationsverdopplungszeit) und histologisch, mit Hilfe des BrDU-Labelings mit anschließender immunhistochemischer Detektion der proliferativen Zellen.

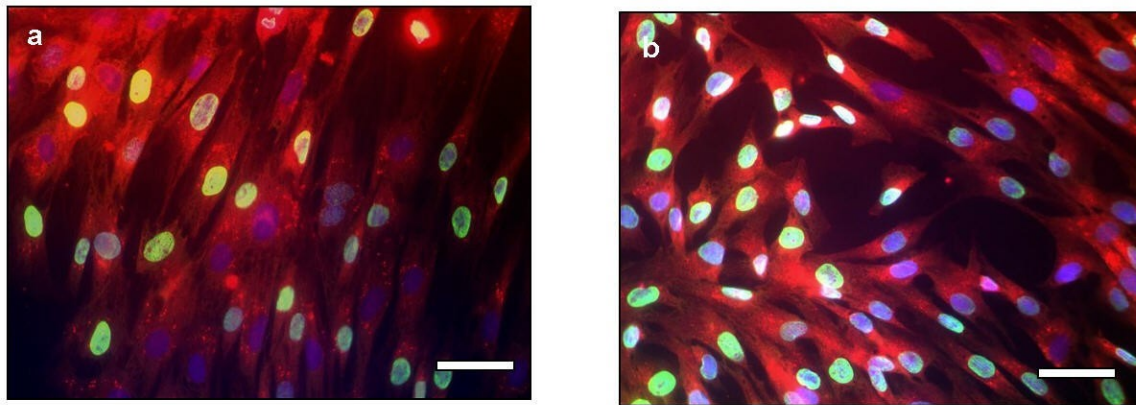
Anhand der ermittelten Generationsverdopplungszeiten konnte dargestellt werden, daß die Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, eine deutlich längere Verdopplungszeit benötigten, als die Zellen, die unter Sauerstoffreduktion (3% Sauerstoffgehalt) kultiviert wurden. Diese Signifikanz stellte sich hauptsächlich bei den Zellen der Passagen 1 dar ( $p < 0,001$ ) ( $n = 5$ ). Die unter Sauerstoffreduktion kultivierten Zellen der Passage 1 benötigten lediglich 43 Stunden  $\pm 11,2\%$ , die unter Standardbedingungen kultivierten Zellen benötigten 87 Stunden  $\pm 47,2\%$ . In den folgenden Passagen, 2 und 3, verringerte sich die Verdopplungszeit unter beiden Kultivierungsbedingungen. So beträgt die Verdopplungszeit in Passage 2 unter Standardbedingungen 30 Stunden  $\pm 4,9\%$  und unter reduziertem Sauerstoffgehalt 25 Stunden  $\pm 1,4\%$ . In Passage 3 verringerte sich die Verdopplungszeit nochmals und der zeitliche Abstand zwischen reduziert kultivierten Zellen, 16 Stunden  $\pm 1,4\%$ , und den standardmäßig kultivierten Zellen, 18 Stunden  $\pm 1,7\%$ , verringerte sich ebenfalls, deshalb liegt keine Signifikanz in den Passagen 2 und 3 vor ( $p = 0,100$ ). Durch die Addition der Werte über drei Passagen ergibt sich in Summe betrachtet jedoch, daß

die Sauerstoffreduktion eine hoch signifikante Reduktion der Generationsverdopplungszeit auf die Zellen hat ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 14 : Generationsverdopplung unter Sauerstoffreduktion (n = 5)**

Unter Verwendung des Proliferationsmarkers BrDU konnten die Befunde zur herabgesetzten Generationsverdopplungszeit unter reduziertem Sauerstoffgehalt bestätigt werden (n = 5). BrDU wurde den Zellen zugefügt und konnte über 24 Stunden von den Zellen aufgenommen werden, was dazu führte, daß die Proliferationsrate innerhalb von 24 Stunden beurteilt werden konnte. Um einen Überblick über die gesamte Zellpopulation zu bekommen, wurden die Kerne mit Hoechst Dye gegengefärbt. So konnte durch Auszählen aller Kerne (Hoechst Dye) und der BrDU-positiven Kerne, die Zahl der proliferierenden Zellen von der Gesamtpopulation bestimmt werden.

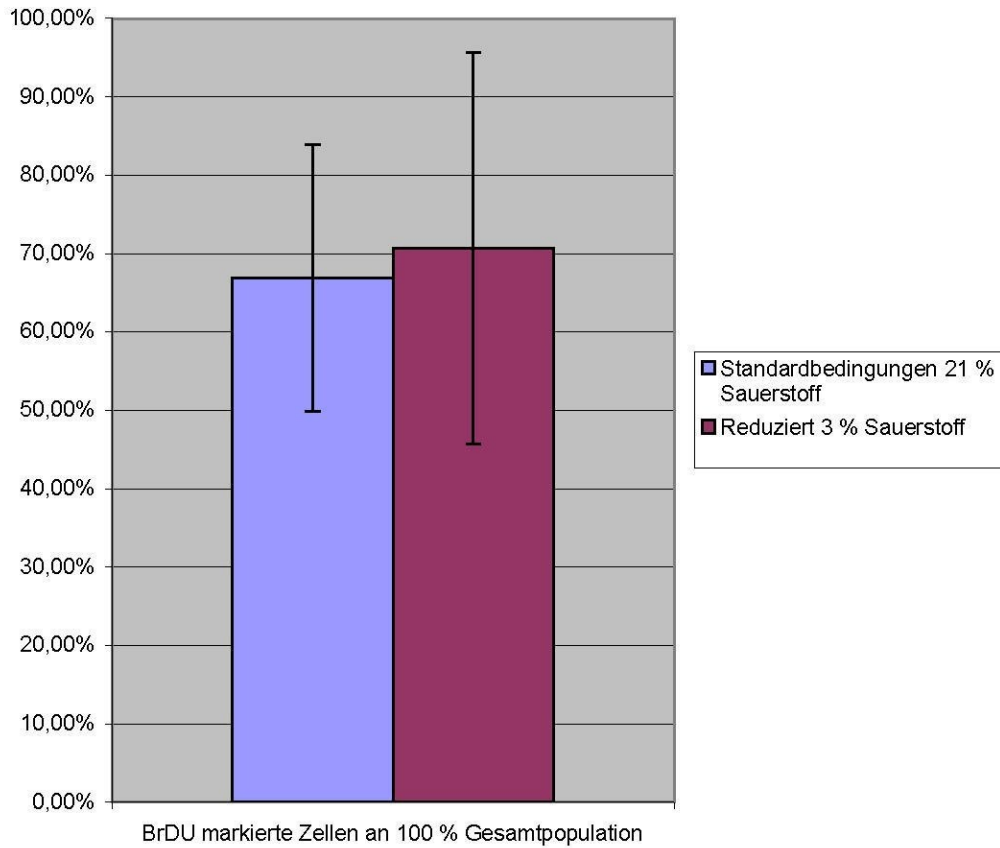


**Abb. 15 : BrDU-Labeling; Kultivierung unter Standardbedingungen und unter Sauerstoffreduktion**

- a) Zellen die unter Standardbedingungen (21% Sauerstoff) kultiviert wurden  
 b) Zellen die unter Sauerstoffreduktion (3% Sauerstoff) kultiviert wurden  
 Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ , (n = 5)

Daß sich unter Sauerstoffreduktion ein Großteil der Zellen in Teilung befand, wird in Abb. 15 deutlich. Prozentual ausgedrückt teilen sich  $70,7\% \pm 8,9\%$  der unter 3% Sauerstoffgehalt kultivierten Zellen. Unter Standardkultivierungsbedingungen, bei einem Sauerstoffgehalt von 21%, teilen sich  $66,9\% \pm 5,9\%$  der Zellen innerhalb eines Tages. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden ( $p = 0,100$ ). Da es sich in diesem Versuch lediglich um ein Zeitfenster von 24 Stunden handelt, wird lediglich eine erhöhte Proliferationsbereitschaft visualisiert. Die Signifikanz der Sauerstoffreduktion wird erst bei einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen sichtbar. Desweiteren ist eine genaue Auszählung der Zellen vom Zeitpunkt des Ausplattierens bis zu Ablösen der Zellen möglich. Im oben beschriebenen Verfahren werden nur Teile der Schale ausgezählt und somit die tatsächliche Zellzahl der Schale nicht erfasst.





**Abb. 16 : BrDU-Markierung,**

Prozentualer Anteil der BrDU markierten Zellen, sich in Teilung befindenden Zellen an der Gesamtzellzahl, sowohl unter Standardbedingungen bei 21% Sauerstoffgehalt als auch bei reduziertem Sauerstoffgehalt von 3%, (n = 5)

### 3.7. Untersuchung zur Proliferationsaktivität und zur Zellemorphologie in unterschiedlichen Seren und Medien

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, ob die Verwendung unterschiedlicher Medien und Seren einen Einfluß auf die Zellvitalität und damit auf die Zellmorphologie hat (n = 3).

Dazu wurden zwei Medien verwendet. Zum einen das in der Literatur beschriebene DMEM, das für die Kultivierung von Pferdezellen standardmäßig verwendet wird, und zum anderen  $\alpha$ MEM, das üblicherweise als Standardmedium in der Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen Verwendung findet (Hegewald et al. 2004a; Klinz et al. 2005; Arnhold et al. 2006b).

Als Seren fanden verschiedene adulte Pferdeseren (in Medium 1-3), sowie ein Fohlenserum (in Medium 4) und ein Kälberserum (in Medium 5) Verwendung.

Alle Pferdeseren wurden in einer Konzentration von 10% und das Kälberserum in einer Konzentration von 20% eingesetzt. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Seren wurden aus Angaben unterschiedlicher Protokolle in diesen Versuch übernommen (Lennon et al. 1996; Fortier et al. 1998; Hegewald et al. 2004a; Smith et al. 2003a; Koerner et al. 2006; Carstanjen et al. 2006).

Es wurden alle fünf Seren sowohl in DMEM als auch in  $\alpha$ MEM eingesetzt, so daß letztlich die Daten aus 10 Medienspezifikationen analysiert wurden.

In den ersten fünf Tagen nach dem Ausplattieren waren in keinem der Ansätze Zellen zu erkennen. Am sechsten Tag konnten jedoch in allen Schalen vereinzelte Zellen detektiert werden.

In dieser Initialphase wiesen die Zellen keine morphologischen Unterschiede auf. Das änderte sich jedoch nach der ersten Passage, die am 9. Tag nach dem Ausplattieren bei allen Schalen erfolgte.

Sowohl in DMEM als auch in  $\alpha$ MEM konnte beobachtet werden, daß die Zellen die mit den Seren 2 und 4 (2 = adultes Pferdeserum, 4 = Fohlenserum) kultiviert wurden, deutliche morphologische Abweichungen gegenüber den anderen Kulturbedingungen aufwiesen (Abb. 18 b + d und Abb. 19 g + i).

Diese Zellen zeigten ein rundes Erscheinungsbild mit multipler Vakuolenbildung und einer adipogenen Differenzierung der Zellen. Die deutlichsten morphologischen Unterschiede wurden allerdings im Fohlenserum (Serum 4) sichtbar. Hier stellten sich die Fettvakuolen besonders groß und deutlich dar, was darauf schließen ließ, daß das Fohlenserum trophische Substanzen enthielt, wodurch eine hypertrophe Stoffwechsellaage induziert wurde. Dagegen waren die Zellen in ihrem Proliferationsverhalten gehemmt, so daß die Zellen bereits in Passage 2 nicht weiterkultiviert werden konnten. Die Zellen, die in den anderen Seren (DHS 1 und 3, sowie FCS 5) kultiviert wurden, zeigten wiederum das typische spindelförmige Aussehen, sie waren lang gestreckt und von schlanker Morphologie (Abb. 18 a,c und e; Abb. 19 h+j). Die Zellen, die in den Seren DHS 2 und DHS 4 (DHS 2 = adultes Pferdeserum, DHS 4 = Fohlenserum) kultiviert wurden, wiesen neben der veränderten Morphologie ein verringertes Proliferationsvermögen auf. Deshalb wurden diese Zellen bereits in sehr frühen Passagen (Tab. 8 nicht mehr weiter

kultiviert. In  $\alpha$ MEM mit DHS 2 wurden die Zellen in Passage 7 mit einer Schalenkonfluenz von 60% nicht weiterkultiviert, da sie sich groß und rund darstellten. Die Zellen zeigten eine Zunahme an Fettvakuolen unterschiedlicher Größe, die mit steigender Kultivierungsdauer ineinander konfluieren. Diese Zellen wurden über 28 Tage kultiviert, wobei die Besatzdichte der Zellen in der Schale bei einer Konfluenz von 60% stagnierte. Die eMSC, die in  $\alpha$ MEM mit DHS 4 kultiviert wurden, konnten ebenfalls nur bis in Passage 6 kultiviert werden. Sie zeigten erhebliche morphologische Veränderungen und eine Stagnation des Proliferationsverhalten bei 40%, bei einer Kultivierungsdauer von 29 Tagen. Diese Zellen stellten sich rund und groß dar, wobei auch hier die Anzahl und Größe der Vakuolen der Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer anstieg. Die in DMEM kultivierten Zellen zeigten ein ähnliches Bild. Die eMSC erreichten in DMEM zusammen mit dem Serum DHS 2 die Passage 6, hatten ein rundes und vakuolenhaltiges Erscheinungsbild und neigten zur Agglutination (Abb. 19 g). Die Kultivierungsdauer in Passage 6 erstreckte sich über 20 Tage, was bedeutet, daß die Proliferation bei einer Schalendichte von 40% stagnierte. Am schlechtesten proliferierten die Zellen in DMEM mit DHS 4 (Abb. 19 i), in diesem Medium erreichten die Zellen nur die Passage 3 und wurden von der weiteren Kultivierung ausgeschlossen. Es handelte sich bei diesen Zellen um sehr große Zellen, mit einem ausgeprägten Vakuolenanteil. Die Kultivierungsdauer erstreckte sich in dieser Passage über 15 Tage, in denen keine Proliferation mehr stattgefunden hatte. Die Zellen, die in dem Serum 1 (adultes Pferdeserum) kultiviert wurden, konnten in  $\alpha$ MEM bis zur Passage 8 kultiviert werden, in DMEM jedoch nur bis Passage 4 (Abb. 19 f).

Deutlich länger konnten die Zellen in den Seren 3 und 5 (3 = adultes Pferdeserum und 5 = Kälberserum) passagiert werden. Diese Zellen erreichten die Passagenzahlen 12 bis 14 (Abb. 18 c + e; Abb. 19 h + i). In der Morphologie unterschieden sich diese Zellen nicht, lediglich in ihrem Proliferationsvermögen, das sich sowohl in der Zellzahl als auch in der Proliferationsgeschwindigkeit ausdrückte. Im Serum DHS 3 konnte in  $\alpha$ MEM die Passage 14 und in DMEM die Passage 12 erreicht werden. In beiden Kulturen stellten sich die eMSC langgestreckt und von üblicher Morphologie, mit Neigung zur Agglutination, dar. Die Proliferation stagnierte bei einer Dichte von 50% und einer Kultivierungsdauer von 15 Tagen. In DMEM mit FCS 5 erreichten die Zellen Passage 13, wobei sie keine morphologischen



Veränderungen aufwiesen. Die höchste Passage, nämlich 14, wurde auch mit den eMSC in  $\alpha$ MEM und FCS 5 erreicht. Sie zeigten ebenfalls keine morphologischen Veränderungen, aber aufgrund der stagnierenden Proliferation nach einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen, in Passage 14, und einer Besatzdichte von 20% mußte die Kultur abgebrochen werden.

Im Zuge der Untersuchung zu den besten Kultivierungsbedingungen erwiesen sich zwei Seren als besonders geeignet. Dazu gehörte das adulte Pferdeserum (Serum 3) und das Kälberserum (Serum 5).

Insgesamt zeigte sich, daß unter Verwendung von  $\alpha$ MEM in Verbindung mit dem Kälberserum (FCS 20%) die höchsten Passagenzahlen, P 13 und P14, und die niedrigsten Verdopplungszeiten, 21 Stunden in  $\alpha$ MEM und 36 Stunden in DMEM, erzielt werden konnten (Tabelle 8). Darüber hinaus zeigten die eMSC's unter diesen Bedingungen die typische Morphologie für MSC's

Unter Verwendung der unterschiedlichen Seren konnten Unterschiede in der Kultivierungsdauer und der dabei erreichten Zellzahl ermittelt werden. So konnte in  $\alpha$ MEM in Passage 1 mit FCS 5, in einem Kultivierungszeitraum von vier Tagen, eine Anzahl von 1848 Zellen  $\pm 313$  erzielt werden. Im gleichen Zeitraum erreichten die in DHS 1 kultivierten Zellen eine Zellzahl von 1457  $\pm 516$  und die Zellen in DHS 3 1299  $\pm 59$ . Dagegen benötigen die Zellen, die in DHS 2 und DFS 4 kultiviert wurden, einen Zeitraum von sechs Tagen und erreichten, bei ihrer Passage, lediglich eine Zellzahl von 749  $\pm 11$ , DHS 2 und DFS 4 von 220 Zellen  $\pm 66$  (Abb. 20 oben).

In DMEM in Passage 1 konnte ein ähnlicher Verlauf dargestellt werden. Jedoch konnte hier erst am fünften Tag ein sprunghafter Anstieg der Zellzahl, vor allem mit DHS 3 und FCS 5 gezeigt werden. Die in DHS 3 kultivierten Zellen zeigten eine Zellzahl von 1712 Zellen  $\pm 50$ , die in FCS 5 1307 Zellen  $\pm 323$ . Weitere 3 Tage später, am achten Tag, konnten die Zellen die in DHS 1 kultiviert wurden, aufgrund ihrer Konfluenz passagiert werden. Sie hatten bei Passage eine Zellzahl von nur 363 Zellen  $\pm 236$ . Eine noch geringere Zellzahl konnte bei DFS 4 verzeichnet werden, diese konnten erst am 12. Tag nach dem Ausplattieren passagiert werden und zeigten nur 4 Zellen  $\pm 0$  nach dem Ablösen. Gleichermäßen stellten sich die in DHS 2 kultivierten Zellzahlen dar, hier konnten am achten Tag nach dem Ausplattieren ebenfalls nur 4 Zellen  $\pm 0$  nachgewiesen werden.

Die Proliferationstendenzen sind der Abb. 20 oben und unten visuell zu entnehmen.

In Passage 5 mit dem Kultivierungsmedium  $\alpha$ MEM konnte bereits die Zellzahl in DFS 4 nicht mehr bestimmt werden, und sie ist deshalb bereits in dieser Tabelle nicht mehr aufgeführt. Diese Zellen wurden noch einmalig mit passagiert, dann wurde die Kultur jedoch in Passage 6 mangels Proliferation beendet.

Die verbliebenen Seren zeigten unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten der Zellen in ihrem jeweiligen Kultivierungsmedium. So konnten die Zellen, die unter Verwendung von FCS 5 kultiviert wurden, bereits nach drei Tagen von der Schale abgelöst und passagiert werden. Hierbei konnte eine Zellzahl von 577 Zellen  $\pm 35$  ermittelt werden. Am fünften Tag wurden die Zellen aus dem Kultivierungsmedium DHS 2 passagiert. Diese zeigten lediglich eine Zellzahl von 220 Zellen  $\pm 34$ . Jeweils am siebten Tag wurden die Zellen aus DHS 3 und DHS 1 passagiert. Hier wurden ähnliche Zellzahlen ermittelt, DHS 3 mit einer Zellzahl von 582 Zellen  $\pm 54$  und DHS 1 mit einer Zellzahl von 532 Zellen  $\pm 86$ .

Die Passage erfolgte anhand der Konfluenz der Zellen in ihrer Schale.

Hier wurde bereits deutlich, daß das Proliferationsvermögen der Zellen sich zum einen verlangsamte (Tage bis zum erneuten Passagieren und Konfluenz) und zum anderen auch die Proliferationsbereitschaft sank (Zellzahl).

Noch deutlicher stellt sich die Entwicklung in DMEM dar. Bis in Passage 5 konnten sich lediglich zwei Seren durchsetzen. Es handelt sich hierbei um die Seren DHS 3 und FCS 5. Diese wurden beide am vierten Tag nach dem Ausplattieren erneut passagiert und wiesen folgende Zellzahlen auf: DHS 3 zeigte eine Zellzahl von 151 Zellen  $\pm 27$  und in FCS 5 konnten noch 210 Zellen  $\pm 19$  gezählt werden.

$\alpha$ MEM					
Serum	Pferd adult	Pferd adult	Pferd adult	Fohlen	Kälber
Interne Nummer:	1	2	3	4	5
Anteil in % am Medium	10	10	10	10	20
erreichte Passagenzahl	8	7	14	6	14
Verdopplungszeit in Stunden	37	44	40	76	21

DMEM					
Seren:	Pferd adult	Pferd adult	Pferd adult	Fohlen	Kälber
Interne Nummer:	1	2	3	4	5
Anteil in % am Medium	10	10	10	10	20
erreichte Passagenzahl	4	4	12	3	13
Verdopplungszeit in Stunden	65	111	60	214	36

Tabelle 8 : Übersicht der verwendeten Seren (n = 3)

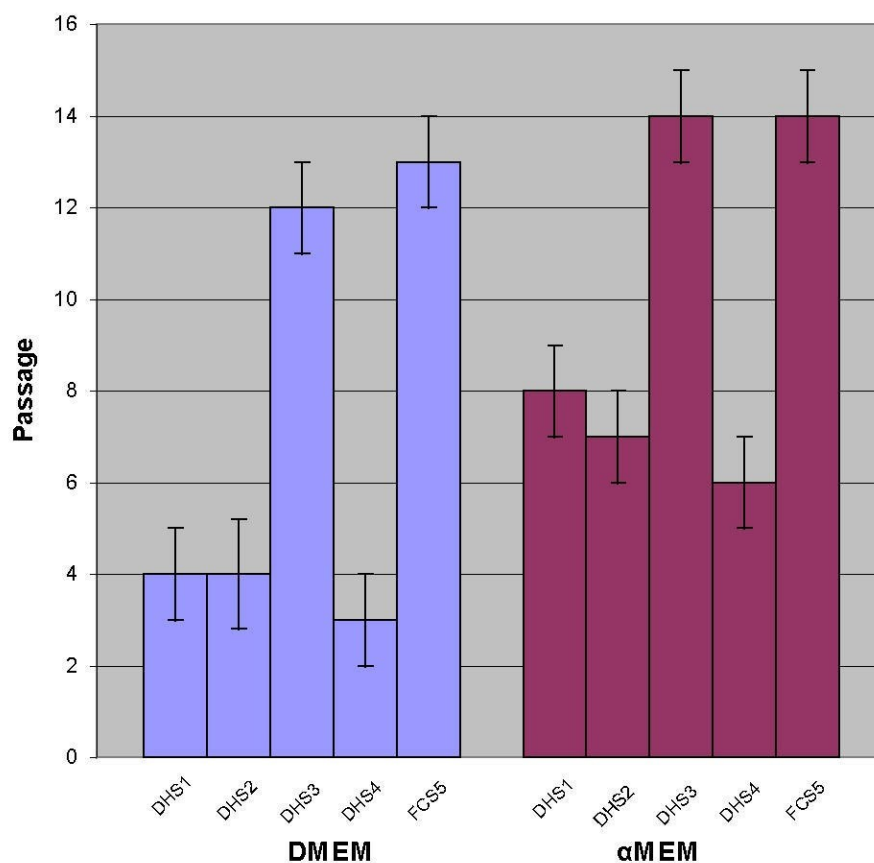
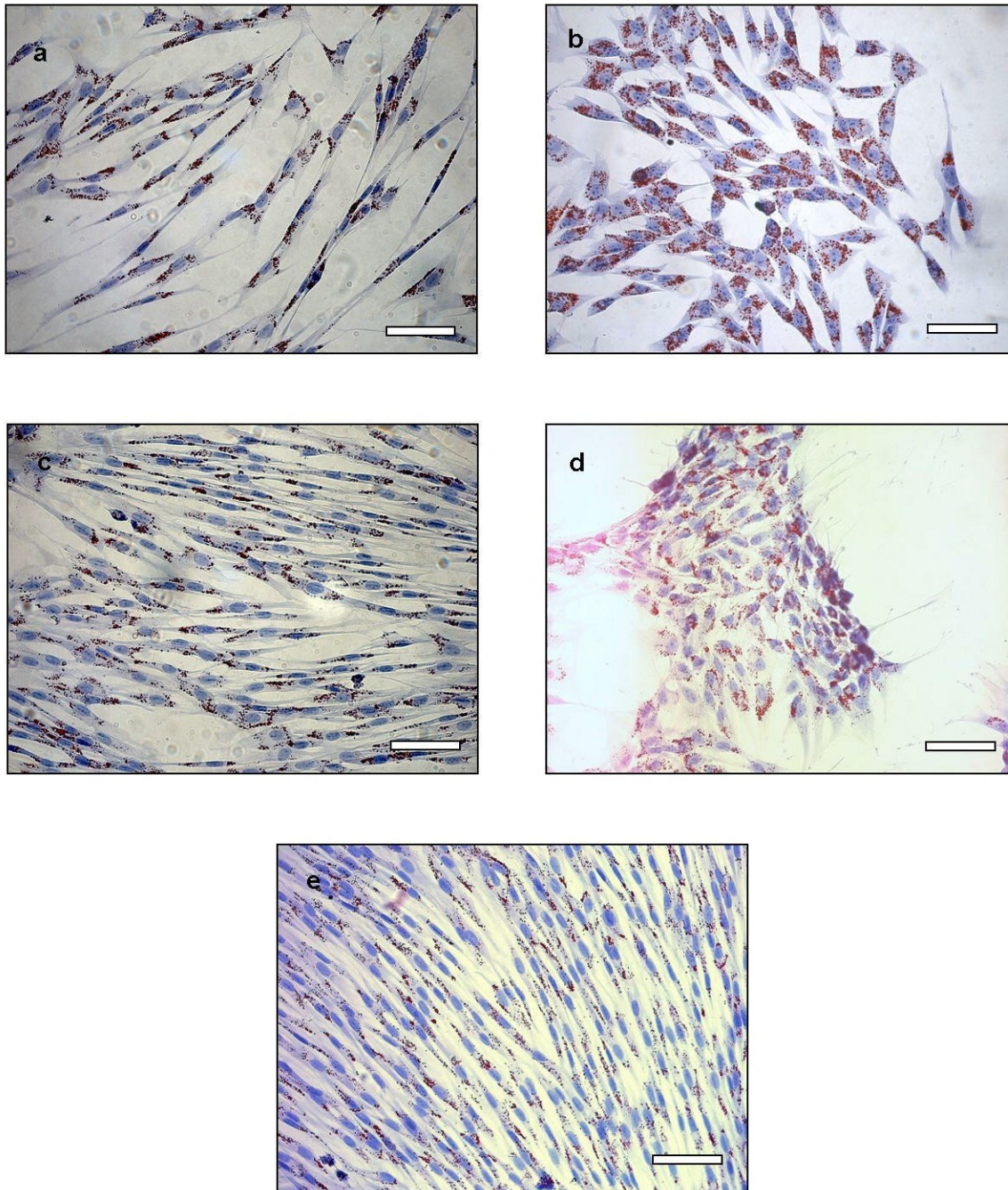
Erreichte Passage in  $\alpha$ MEM und DMEM

Abb. 17 : Übersicht über die zu erzielenden Passagenzahlen unter Verwendung der verschiedenen getesteten Seren (n = 3).



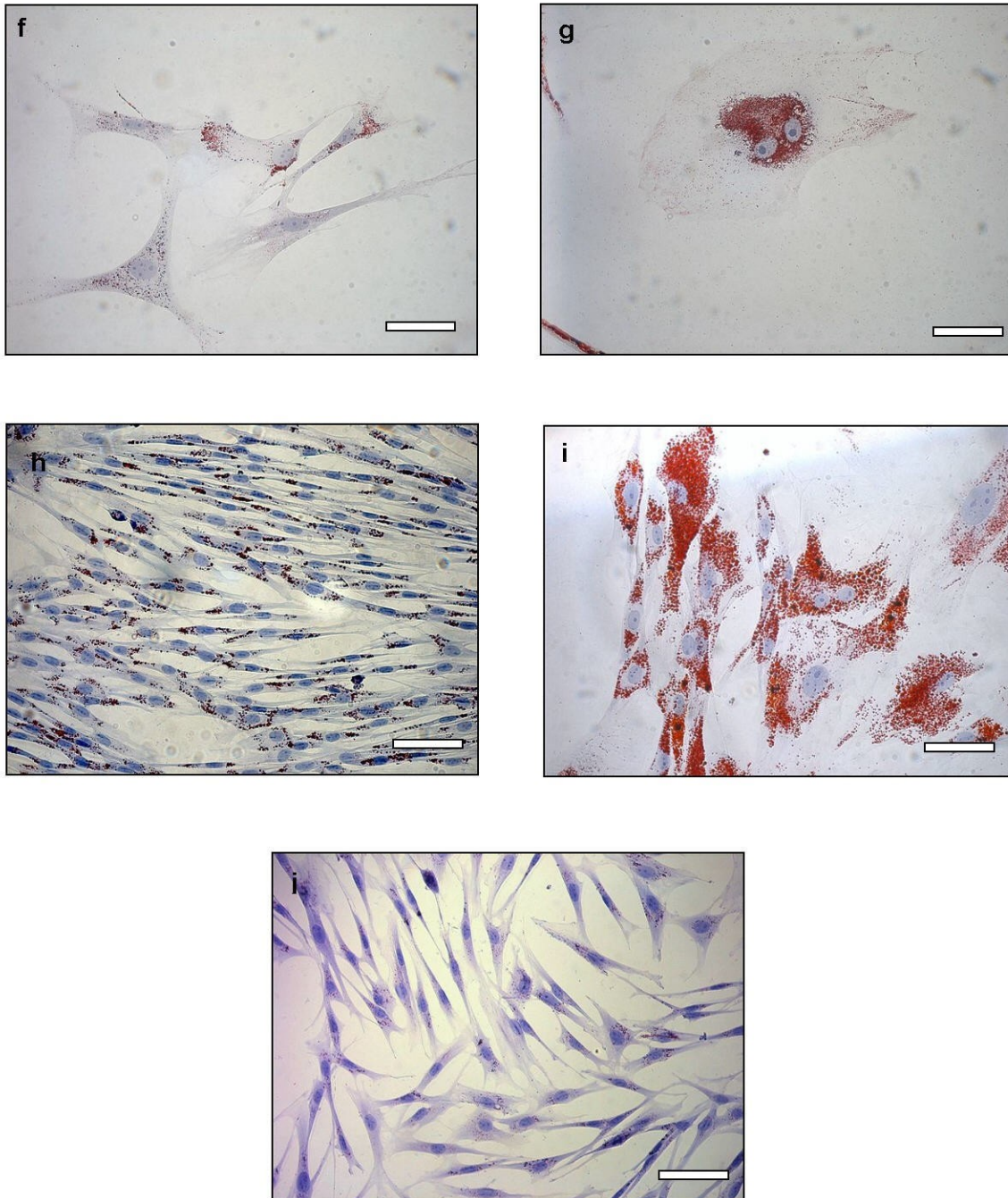
**Abb. 18 : Morphologie der Zellen unter Darstellung der Fettvakuolen in  $\alpha$ MEM (n = 3)**

unter Verwendung von unterschiedlichen Seren

Red Oil/Hämatoxylin Färbung, 25mal, Balken entsprechen 120  $\mu$ m

- a) Donor Horse Serum 1; lang gestreckte Zellen, einige Fettvakuolen, typische Morphologie für eMSC's
- b) Donor Horse Serum 2; rund-ovale Zellen mit deutlicher Fetteinlagerung, entsprechen nicht der typischen Stammzellmorphologie
- c) Donor Horse Serum 3; lang gestreckte Zellen, wenige Fettvakuolen, typische spindelförmige Morphologie
- d) Donor Foal Serum 4; runde Zellen mit stark fetthaltigen Vakuolen
- e) Fetal Calf Serum 5; typische Morphologie für MSC



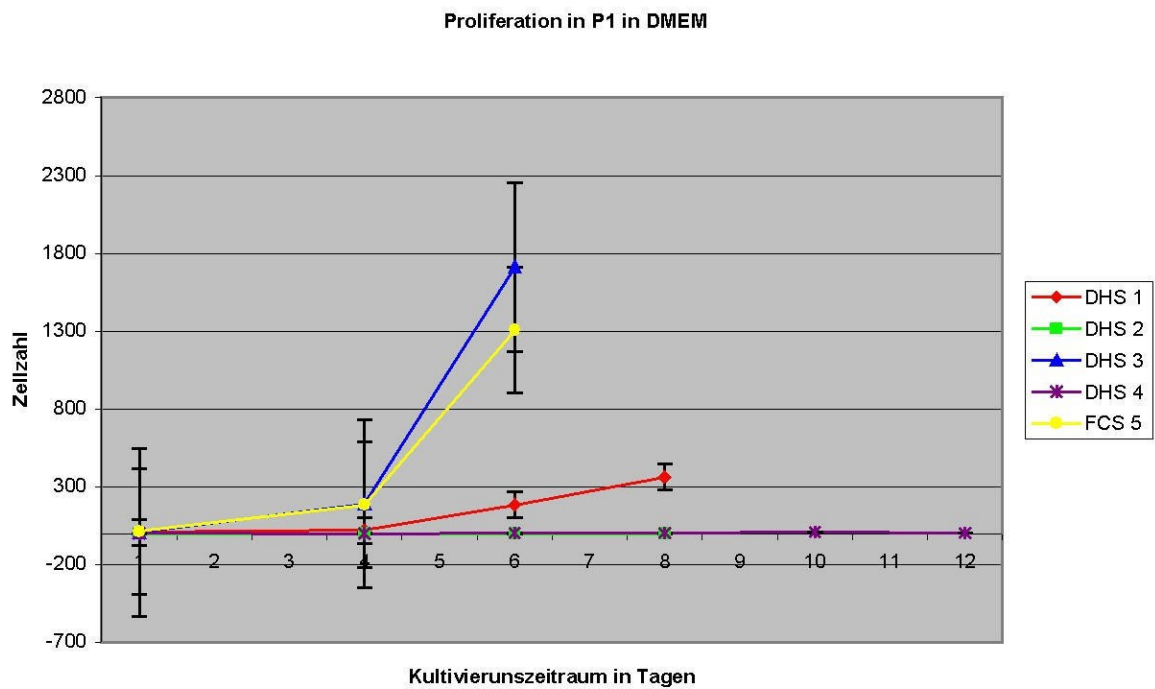
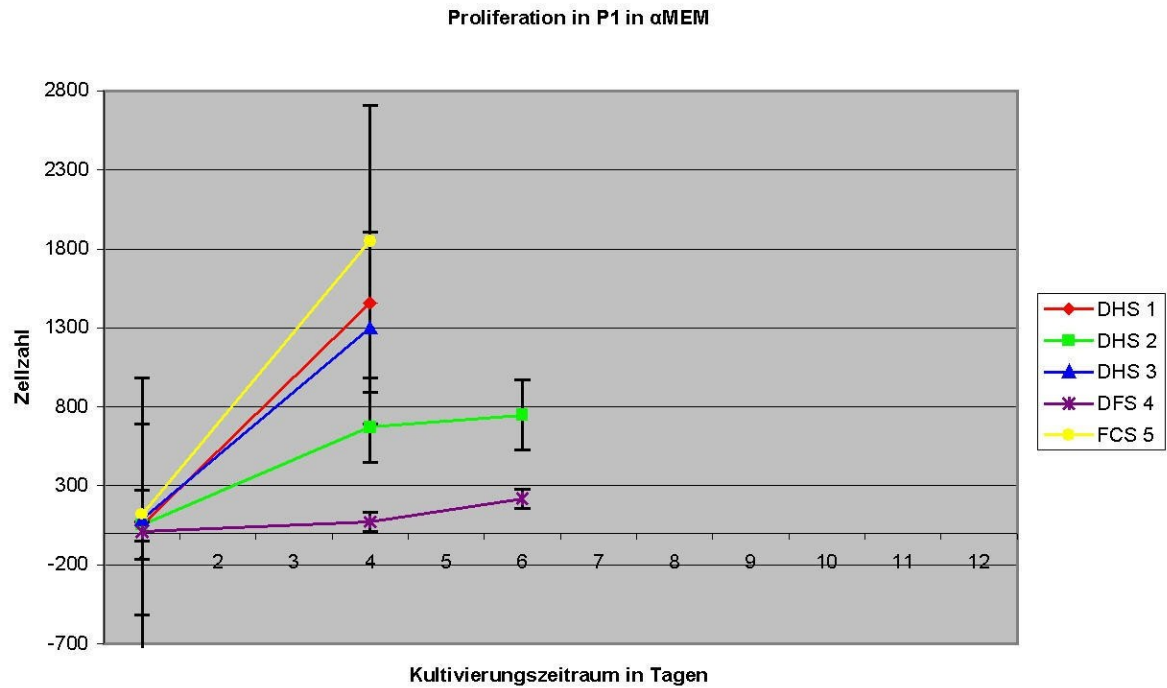


**Abb. 19 : Morphologie der Zellen unter Darstellung der Fettvakuolen in DMEM (n = 3)**

unter Verwendung von unterschiedlichen Seren

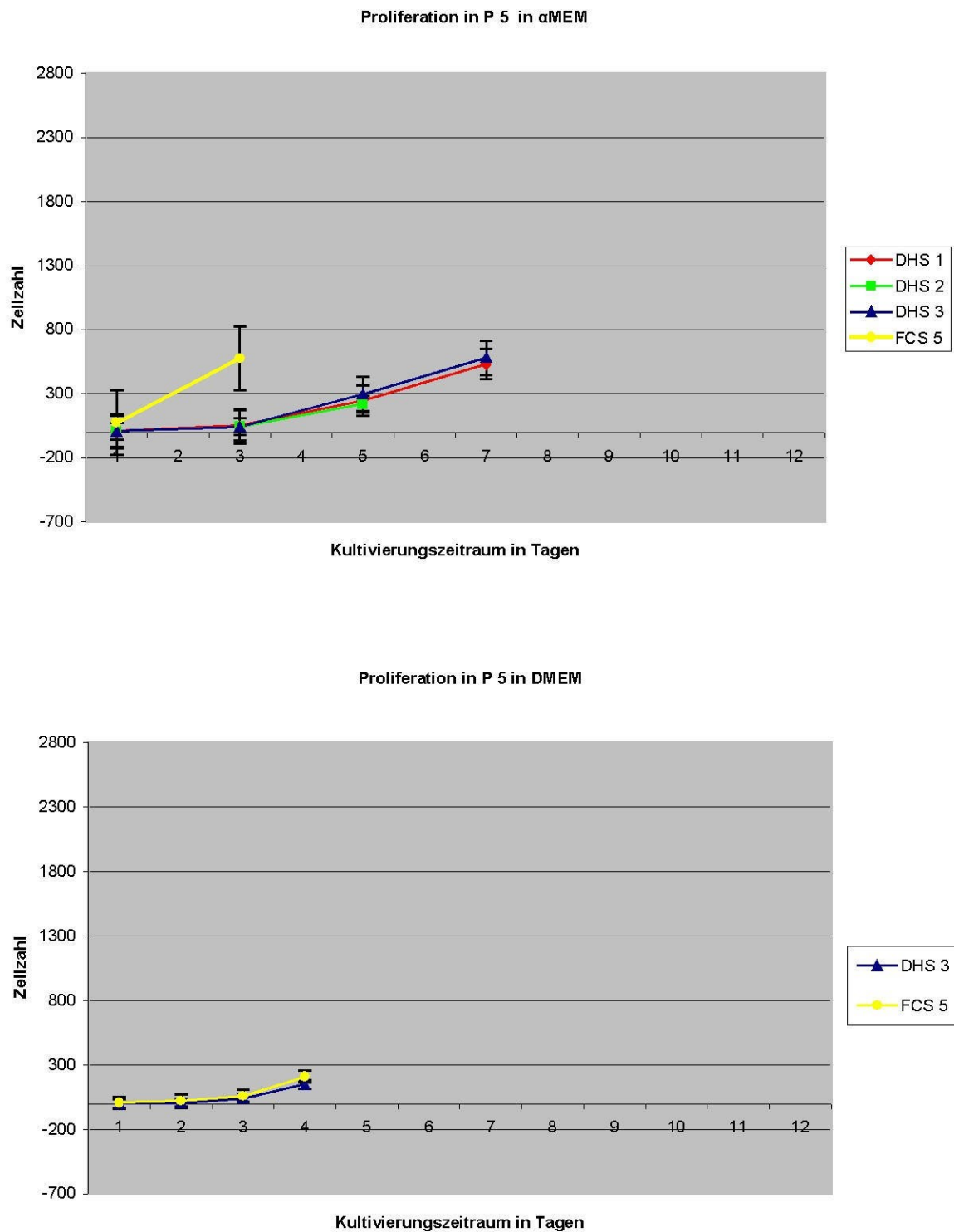
Red Oil/Hämatoxylin Färbung, 25mal; Balken entsprechen 120 µm

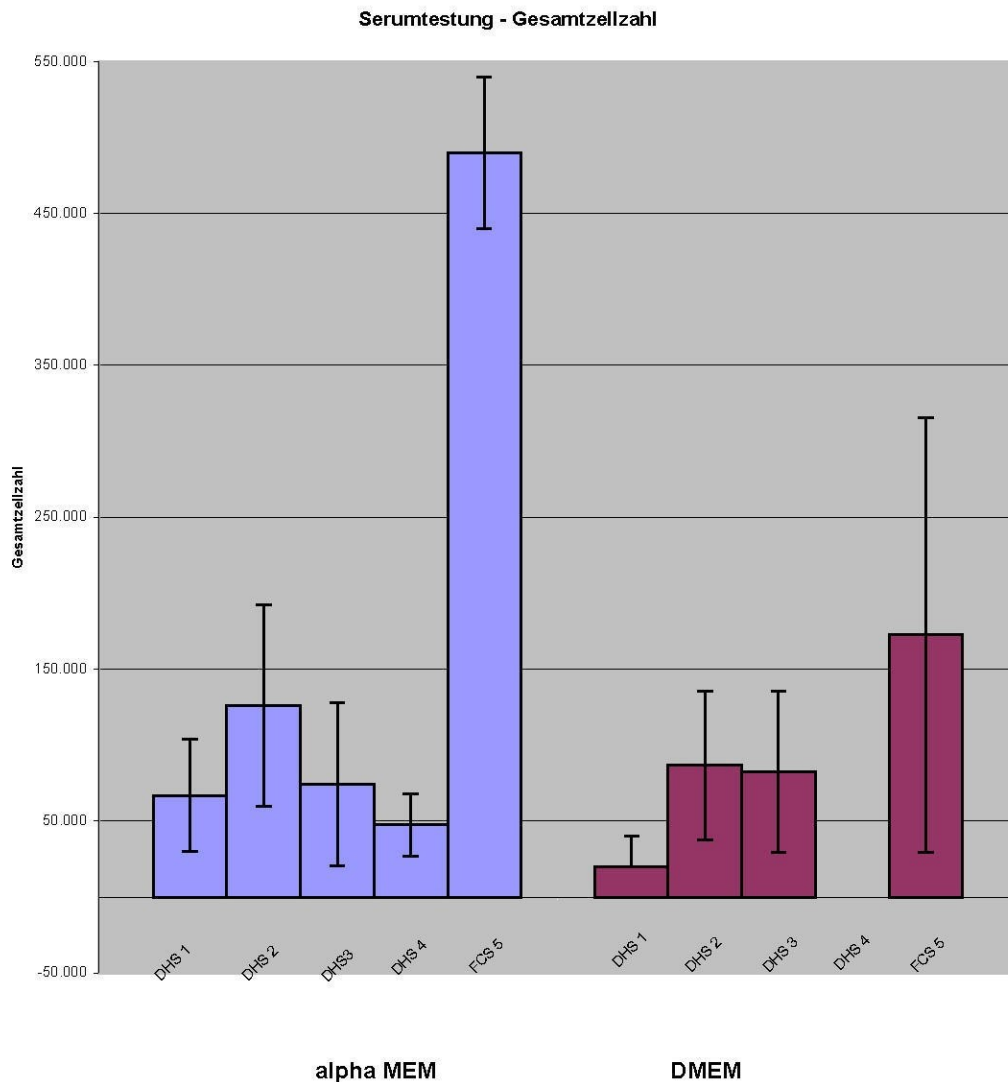
- f) Donor Horse Serum 1 bereits mature Zellen mit Fettvakuolen, die keine typische MSC-Morphologie aufweisen
- g) Donor Horse Serum 2; sehr große, unförmige Zellen, angefüllt mit Fettvakuolen, keine typische Morphologie für MSC mehr vorhanden
- h) Donor Horse Serum 3; eMSC's mit typischer Morphologie, enthalten einige Fettvakuolen
- i) Donor Foal Serum 4; Zellen sind fast ausschließlich mit Fettvakuolen gefüllt, so dass die Perikarien kaum noch sichtbar sind
- j) Fetal Calf Serum 5; typische Morphologie für MSC's



**Abb. 20 : Proliferation in Passage 1 in  $\alpha$ MEM (oben) und DMEM (unten) (n = 3)**

Es werden die unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten und die erreichten Zellzahlen auf die Kultivierungsdauer, innerhalb einer Passage, unter Verwendung verschiedener Seren dargestellt.





**Abb. 22 : Serumtestung (n = 3)**

Überblick über das Proliferationsverhalten unter Verwendung verschiedener Seren und Medien

### 3.8. Untersuchung der Zellmigration (wounded healing assay) nach Anfertigung eines Scratches

Um die Migration der eMSC nachvollziehen zu können, wurde in den intakten, konfluenten Zellrasen mit einer blauen Eppendorfpipettenspitze ( $\varnothing$  0,09 cm) an einem Lineal ein gerader Strich in den Zellrasen über die gesamte Petrischale gezogen (n = 8). Dadurch wurde dieser Zellrasen lokal zerstört und es entstand somit an dieser Stelle ein zellfreies Areal. Aufgrund der Zerstörung des Zellrasens wird dieser Migrationsassay auch als Scratch Assay bezeichnet. Nach Anfertigung des

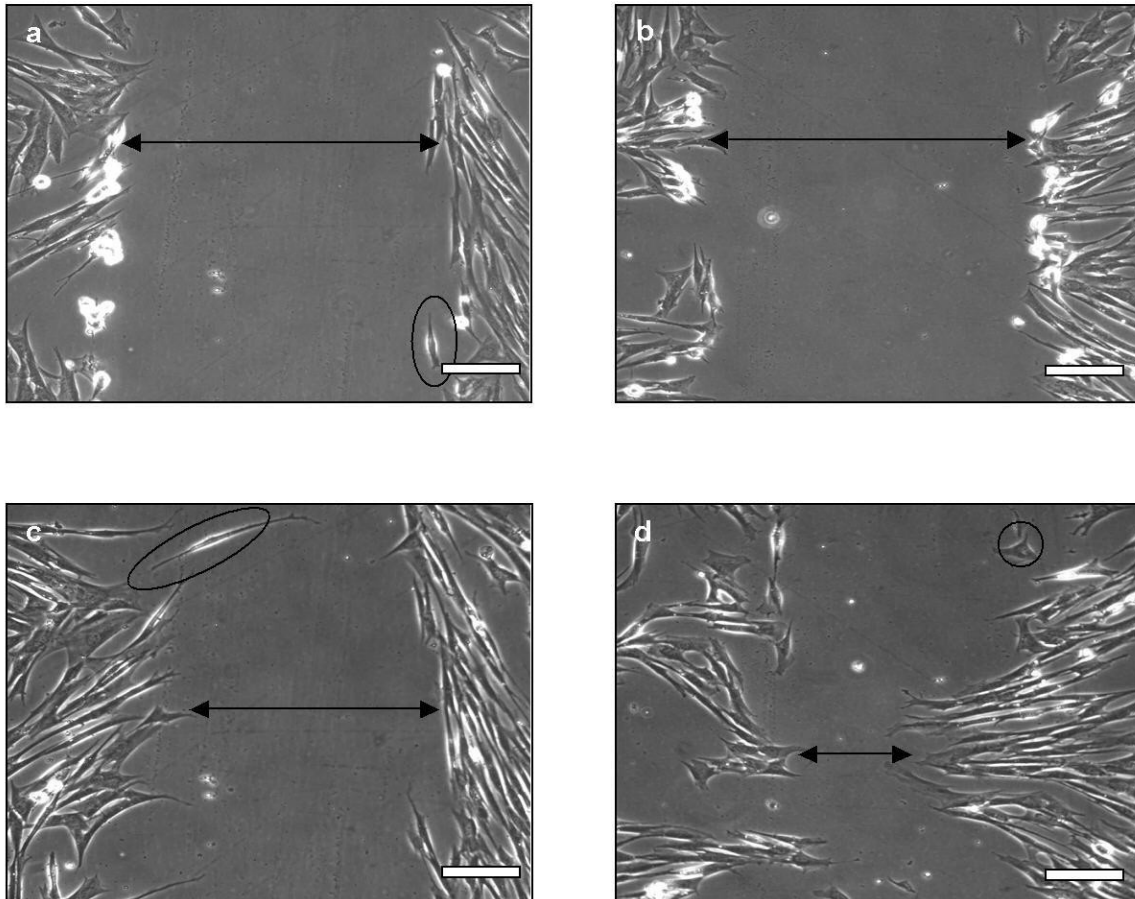


Scratches wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop eine Stelle gesucht, an der die Zellen unterschiedlich ausgerichtet waren. Die Vitalbeobachtung wurde über zwei Tage durchgeführt. Die Zellen bildeten nach dieser Zeit wieder einen Verband, dabei wurde jedoch beobachtet, daß die Zellen, die bereits in Richtung der gegenüberliegenden Seite orientiert waren, schneller auf die andere Seite migrierten als jene Zellen, die vertikal ausgerichtet waren. Dies konnte mit Hilfe einer Phalloidin-Färbung, zur Darstellung der Aktinfilamente, bestätigt werden (Abb. 25). Daß es sich in diesem Fall tatsächlich um Migration und nicht nur um Proliferation mit Verschieben der Zellen handelte, wurde durch die Motilität einzelner Zellen verdeutlicht, die sich aktiv aus ihrem Verband lösten und losgelöst von dem Zellverband auf die gegenüberliegende Seite des Scratches wanderten, um dort schnellstmöglich erneute Zell-Zell-Kontakte aufzunehmen (Abb. 23).

In einem weiteren Versuchsansatz wurde durch Zugabe von Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren getestet, ob diese Einfluß auf die Zellmigration nehmen können. Bei den getesteten Substanzen handelte es sich um Basic fibroblast growth factor (bFGF 1mg/ml) und Interleukin 6 (IL6 10ng/ml). Die Untersuchungen ergaben, daß die Migration der Zellen durch Zugabe von bFGF vollständig gehemmt wurde. Über einen Zeitraum von 42 Stunden konnte keine Zellbewegung verzeichnet werden (ohne Abb.).

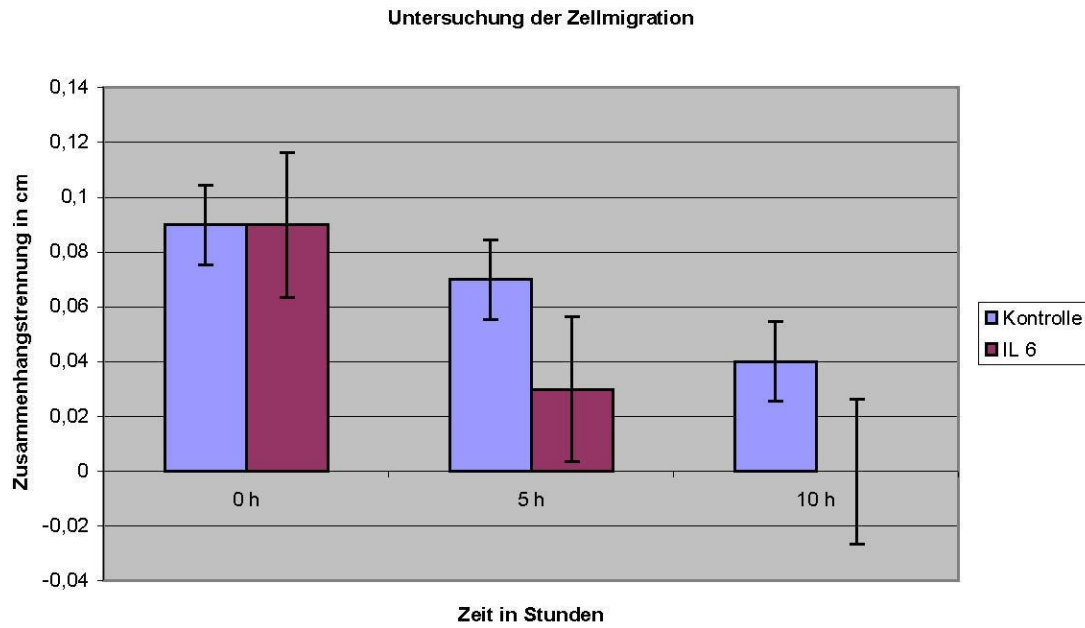
Anders stellte sich dies unter Zugabe von IL 6 dar. IL 6 hat einen positiven Einfluß auf die Migration der Zellen in mehrfacher Hinsicht. Zum einen zeigen die Zellen eine gesteigerte Motilität, sie bewegen sich deutlich schneller als unter Kontrollbedingungen, und IL 6 hat auch einen positiven Effekt auf die Teilungsrate der Zellen. Die gesteigerte Migration unter Zugabe von IL 6, läßt sich durch einen Kontrollscratch unter Standardbedingungen sehr gut verdeutlichen. Die Zellen die mit im IL 6 behandelt wurden, sind zu einem deutlich früheren Zeitpunkt in der Lage, die Zusammenhangstrennung zu verschließen, als das unter Kontrollbedingungen der Fall ist. Das Abwandern erster Zellen aus dem Verband wurde bei den Kontrollscratches nach 2 Stunden  $\pm 20$  Minuten und bei den Scratches, denen IL6 zugefügt wurde, bereits nach 1 Stunde  $\pm 10$  Minuten festgestellt. Bereits 5 Stunden nach Anfertigung des Scratches wurde deutlich, daß sich die Zusammenhangstrennung unter Zugabe von IL6 deutlich früher schloß, bzw. daß die Zellen schneller aufeinander zu migrierten, als dies unter Kontrollbedingungen der Fall war, hier bereits nach 5 Stunden (Abb. 23). Ein vollständiger Verschluß des

Zellrasens wurde bei Zugabe von IL 6 bereits nach  $10 \pm 2,6$  Stunden verzeichnet, unter Kontrollbedingungen erst nach einer Zeitspanne von  $20 \pm 2,1$  Stunden ( $p < 0,001$ ).



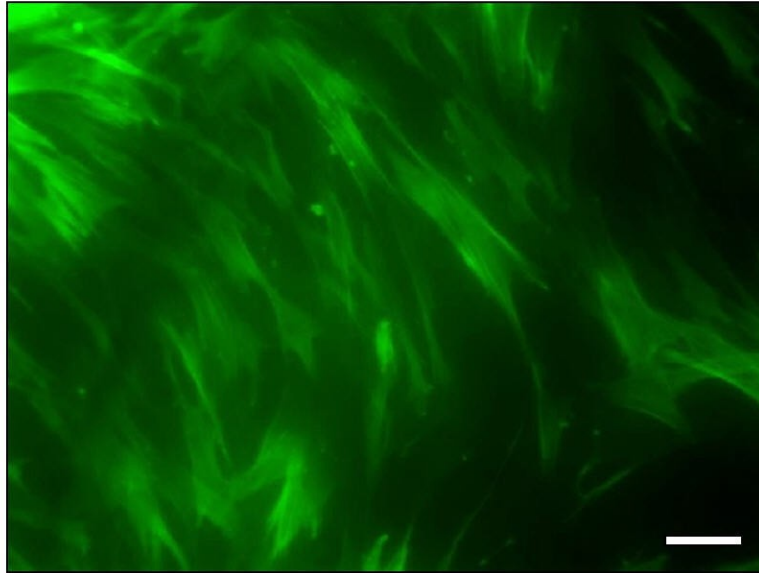
**Abb. 23 : Untersuchung der Zellmigration (wounded healing assay)**

- a) Scratch unter Kontrollbedingungen, zum Zeitpunkt 0
  - b) Scratch unter Zugabe von IL 6, zum Zeitpunkt 0
  - c) Der gleiche Scratch unter Kontrollbedingungen nach 5 Stunden Laufzeit, der Scratch verschließt sich allmählich.
  - d) Der gleiche Scratch unter Zugabe von IL 6, 5 Stunden nach Versuchsbeginn, die Zusammenhangstrennung ist fast vollständig verschlossen.
- Die eingekreisten Zellen zeigen Einzelzellen, die sich vom Verband gelöst haben, c) die Zelle versucht durch Elongation früher einen erneuten Zell-Zell-Kontakt zu erreichen;  
Balken entsprechen  $90 \mu\text{m}$  ( $n = 8$ )



**Abb. 24 : Untersuchung der Zellmigration**

Verschuß der Zusammenhangstrennung der Zellen unter Kontrollbedingungen und unter Zugabe von Interleukin 6 im zeitlichen Verlauf (n = 8)



**Abb. 25 : Scratch Phalloidin gefärbt**

In der Phalloidinfärbung wurden die Aktinfilamente sichtbar, dabei kann die Ausrichtung der Filamente beurteilt werden.

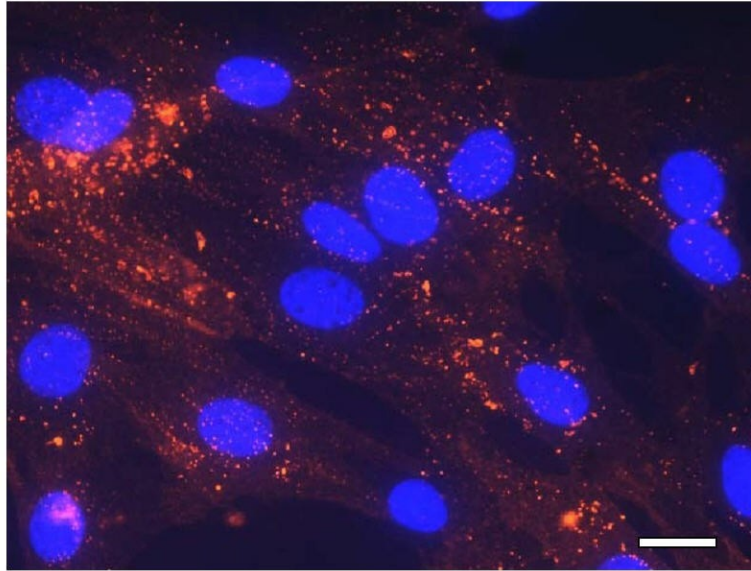
Dabei wird deutlich, wie sie zu den benachbarten Zellen, vor allem zu denen der gegenüberliegenden Seite des Scratches ausrichten; Balken entspricht 30  $\mu\text{m}$ , (n = 8)

### 3.9. Charakterisierung der eMSC mittels einer immunhistochemischen Färbung

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dazu wurden neben der Expression von Stammzell- und Proliferationsmarkern auch die Expression einiger wichtiger Extrazellulärmatrixkomponenten für MSC's dargestellt, die wichtig für den Einsatz der Zellen im Tissue engineering sein könnten.

#### 3.9.1. CD 90 / THY 1

CD 90 / THY 1 wird als ein Marker für die Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen herangezogen. Aus der Expression von CD 90 kann geschlossen werden, daß es sich bei den Zellen um Stammzellen handelt. In dem durchgeführten Versuch konnte eine positive Immunreaktion mit dem Marker CD 90 verzeichnet werden (Abb. 26) (n = 5). Es stellten sich bei 65% der Zellen leuchtend rote Bereiche auf der Oberfläche dar.

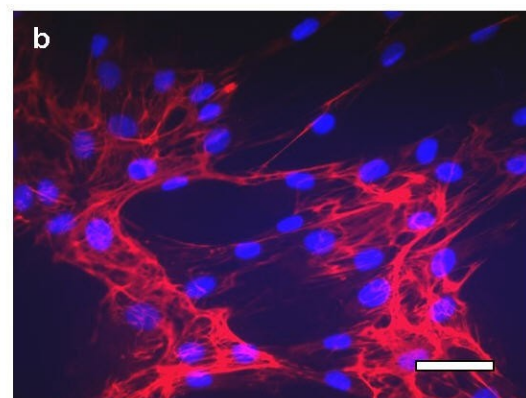
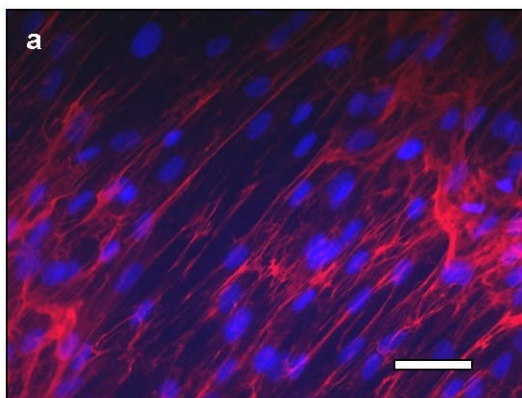


**Abb. 26 : IHC Auswertung CD 90**

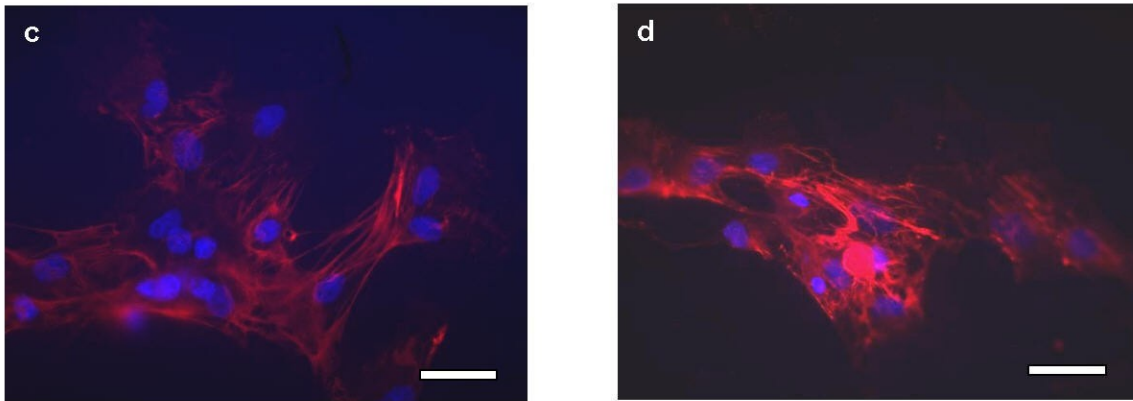
eMSC wurden mit dem Stammzellmarker CD 90 konfrontiert, Zellkerne stellen sich blau dar und leuchtend rot sind die positiv markierten Zellen mit CD 90; Balken entspricht 15  $\mu\text{m}$  (n = 5)

### 3.9.2. Perlecan und Fibronectin

Perlecan und Fibronectin sind Bestandteile der Extrazellulärmatrix (EZM) der Zellen. Ein positiver Nachweis für die Expression von Fibronectin bedeutete, daß die Zellen EZM produzieren. In den durchgeführten Versuchen konnte die Expression von Perlecan und Fibronectin nachgewiesen werden (n = 6). Die Expression der EZM-Moleküle konnte unter verschiedenen Kulturbedingungen, beispielsweise auch nach Induktion der osteogenen und adipogenen Differenzierungsrichtung, ohne Unterschiede aufzuweisen, nachgewiesen werden (Abb. 27). Anhand dieser immunhistologischen Methode konnte für Perlecan eine Expressionsrate von 73 %  $\pm 10,4\%$  und für Fibronectin eine Rate von 86%  $\pm 10,7\%$  ermittelt werden.







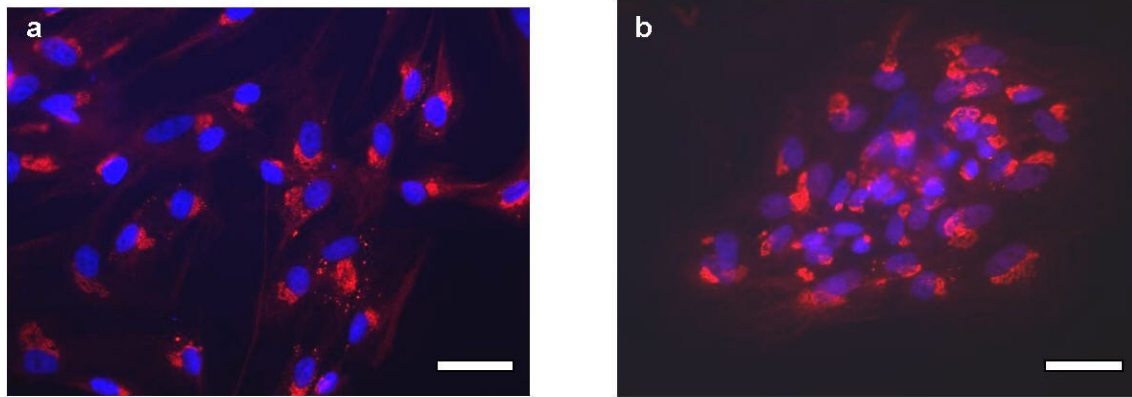
**Abb. 27 : Immunhistochemische Färbungen; Fibronectin positive eMSC**

- a) in 20 % FCS kultiviert, Zellkerne stellen sich schlank und blau dar, Fibronectinexpression leuchtend rot
  - b) in 10 % DHS kultiviert, Zellkerne blau und dicht, Fibronectinexpression rot
  - c) in Adipozytendifferenzierungsmedium kultiviert, Zellkerne sind blau und rund, Fibronectinfäden
  - d) in Osteozytenmedium kultiviert, auch hier lässt sich eine Fibronectinexpression darstellen
- Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$  (n = 6)

### 3.9.3. Expression von $\beta 1$ Integrin

Um darzustellen, wie die eMSC's mit ihrer EZM gekoppelt sind, wurde die Expression von  $\beta 1$  Integrin, einem transmembranären Molekül, untersucht, über das eine Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Bindung dargestellt werden kann (n = 5). Dieser heterodimere Rezeptor bildet Brücken zwischen dem zytoplasmatischen Aktin Zytoskelett und den Proteinen der EZM der eMSC's.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises dargestellt werden, daß die eMSC's zu 100%  $\beta 1$ -Integrin exprimieren (Abb. 28).



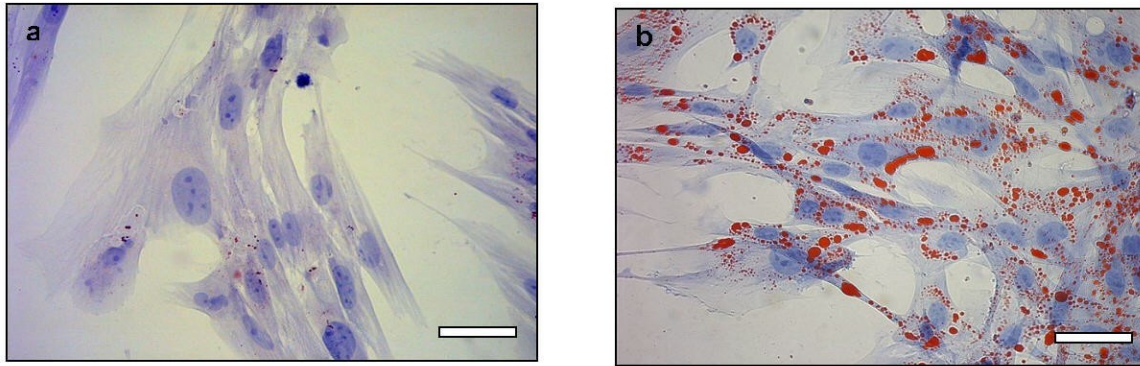
**Abb. 28 : Immunhistochemische Färbung  $\beta 1$  Integrin positiver eMSC**

- a)  $\beta 1$  Integrinexpression: eMSC, die in 20 % FCS mit  $\alpha$ MEM kultiviert wurden  
 b)  $\beta 1$  Integrinexpression: Kultivierung der eMSC in Osteozytenmedium  
 Balken entspricht 100  $\mu$ m (n = 5)

### 3.10. Untersuchung zur Pluripotenz der eMSC's anhand des adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungspotentials

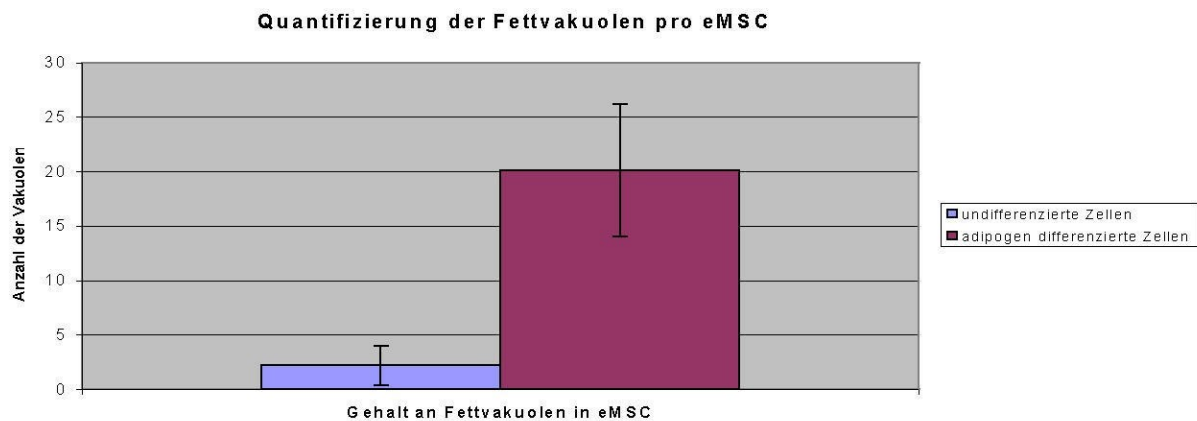
#### 3.10.1. Adipogenes Differenzierungspotential

Das adipogene Differenzierungspotential konnte mit Hilfe der Red Oil Färbung dargestellt werden (n = 10). Intrazelluläre Fettvakuolen stellen sich mit dieser Färbung leuchtend rot dar. Eine Akkumulation von Fettvakuolen ist ein Hinweis für das adipogene Differenzierungspotential. Dieser Versuch wurde sowohl mit primären als auch kryoprotektierten Zellen durchgeführt. Bereits in den undifferenzierten Zellen kann eine geringe Anzahl von Fettvakuolen detektiert werden. Die durchschnittliche Anzahl lag bei  $2,2 \pm 1,8$  Vakuolen pro Zelle. Bei den differenzierten Zellen konnte jedoch eine deutlich höhere Anzahl von  $20,1 \pm 6,1$  Vakuolen pro Zelle (primäre Zellen [p < 0,001]) ermittelt werden. Bei den vorab kryokonservierten Zellen konnte die Anzahl der Vakuolen auf  $21,4 \pm 7,8$  (p < 0,001) bestimmt werden. Hieraus ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen primären Zellen und Zellen, die im Vorfeld kryoprotktiert wurden (p = 0,100).



**Abb. 29 : Adipogene Differenzierung**

- a) kultiviert im Standardmedium ( $\alpha$ MEM mit 20 % FCS);  
 b) Akkumulation von Fettvakuolen im adipogenen Differenzierungsmedium  
 Balken entspricht 80  $\mu$ m (n = 10)



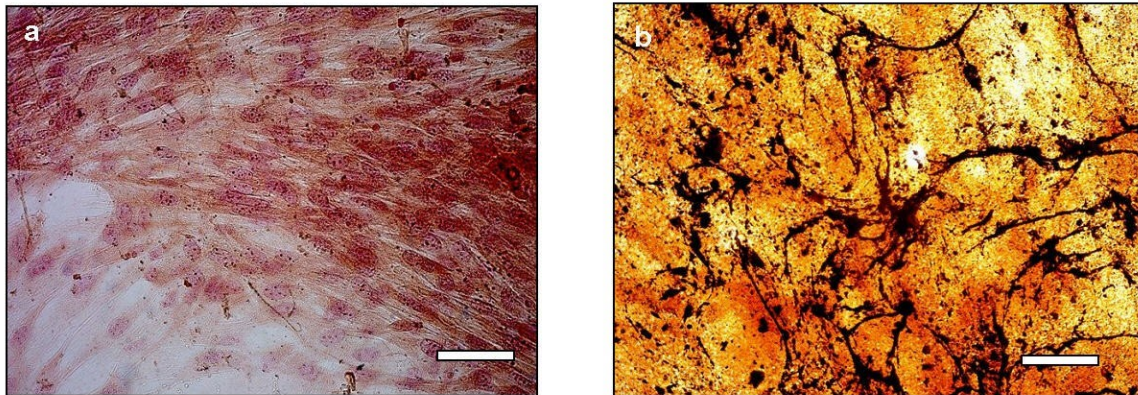
**Abb. 30 : Vakuolen in Fettdifferenzierung (n = 10)**

### 3.10.2. Osteogenes Differenzierungspotential

Ähnlich dem adipogenen Differenzierungspotential konnten nach zehntägiger Kultivierung der Zellen im osteogenen Medium deutliche osteogene Differenzierungsanzeichen dargestellt werden (n = 10). Mit Hilfe der Van-Kossa-Färbung wurde die kalzifizierte Extrazellulärmatrix dargestellt. Das mineralisierte Gewebe zeichnete sich durch eine deutliche Schwarzfärbung aus. Die Verteilung der schwarzen Präzipitate war keinesfalls homogen, vielmehr konnten schwarze, Knochenbälkchen ähnliche Strukturen detektiert werden. Die Bälkchen bildeten



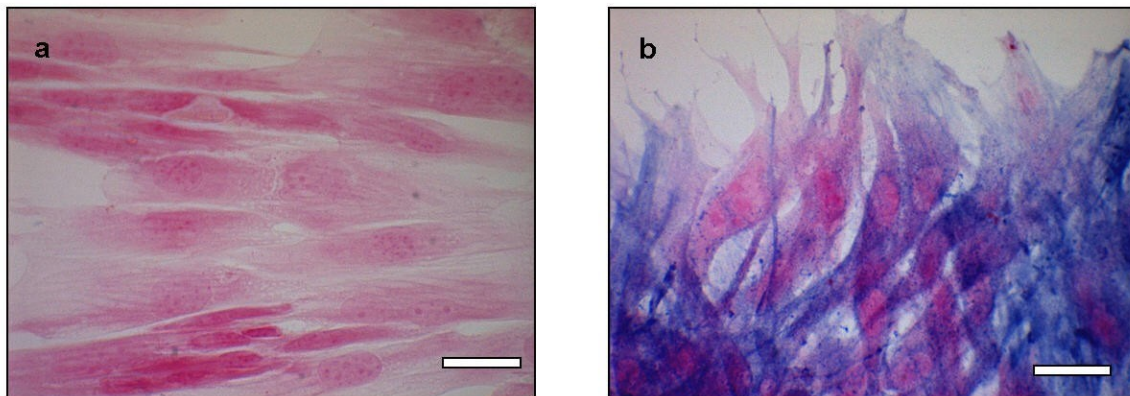
gerüstartige Strukturen. Um das umgebende Gewebe und Zellen darzustellen, wurden die Zellen mit Kernechtrot gegengefärbt.



**Abb. 31 : Osteogene Differenzierung, Van-Kossa-Färbung**

- a) Kontrollzellpopulation in Standardmedium zur osteogenen Differenzierung in der Kunststoffschale, Gegenfärbung Kernechtrot
- b) im osteogenen Differenzierungsmedium kommt es zu einer verstärkten Ossifikation (Verkalkung), was sich in der Versilberung schwarz darstellt. Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$  (n = 10)

Unter Zuhilfenahme der alkalischen Phosphatasefärbung (NBT-Färbung) wurde das osteogene Potential bestätigt. Die stärkere Blaufärbung im ALP-Nachweis der differenzierten Zellen konnte mit Hilfe eines densitometrischen Meßverfahrens bestätigt werden. Dazu wurden verschiedene Grauwerte (Densitometric Units) ermittelt.

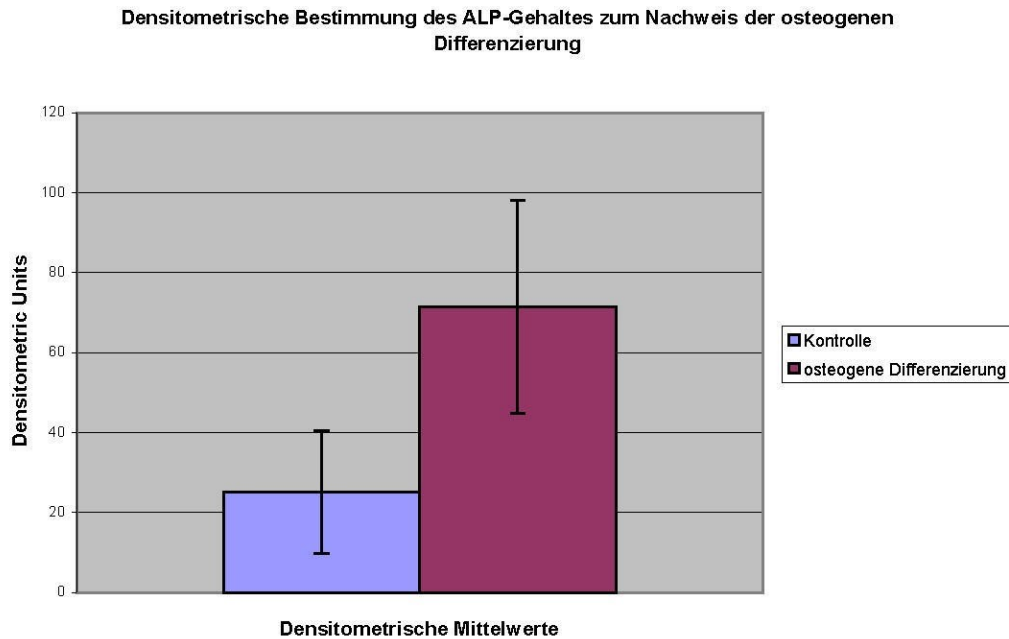


**Abb. 32 : Osteogene Differenzierung, NBT-Färbung**

- a) Zellen kultiviert im Kontrollmedium, wesentlich geringere oder keine Blaufärbung, Kerne wurden mit Kernechtrot gefärbt, Balken entspricht 80  $\mu\text{m}$  (n = 10)
- b) osteogene Differenzierung, gefärbt mit NBT zum ALP-Nachweis, deutlich wurde die Blaufärbung der Perikarya, Balken entspricht 80  $\mu\text{m}$

Dabei ergaben die Messungen folgendes Ergebnis:

Die nicht differenzierten Zellen zeigten nur einen geringen Grauwert, von  $19,8 \pm 4,3$  densitometrischen Einheiten bei primären Zellen und  $18,1 \pm 3,5$  Einheiten bei den kryoprotektierten Zellen. Die leichte Graufärbung von 19,8 und 18,1 Einheiten konnte auf die Gegenfärbung mit Kernechtrot zurückgeführt werden, die zur Kontrastierung der Zellkörper herangezogen wurde. Die osteogen differenzierten Zellen zeigten einen deutlich höheren ALP-Gehalt, der in dieser Messung als höherer Grauwert, ausgedrückt in  $63,8 \pm 8,5$  bei den primären ( $p < 0,001$ ) und nach Kryoprotektion  $57,8 \pm 8,7$  ( $p < 0,001$ ) densitometrische Einheiten, ermittelt wurde. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen primären und kryoprotektierten Zellen ermittelt werden ( $p = 0,1$ ).



**Abb. 33 : Densitometrische Bestimmung der osteogenen Differenzierung im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen (n = 10)**

### 3.10.3. Chondrogenes Differenzierungspotential

#### 3.10.3.1. Auswertung mittels histologischer Färbungen

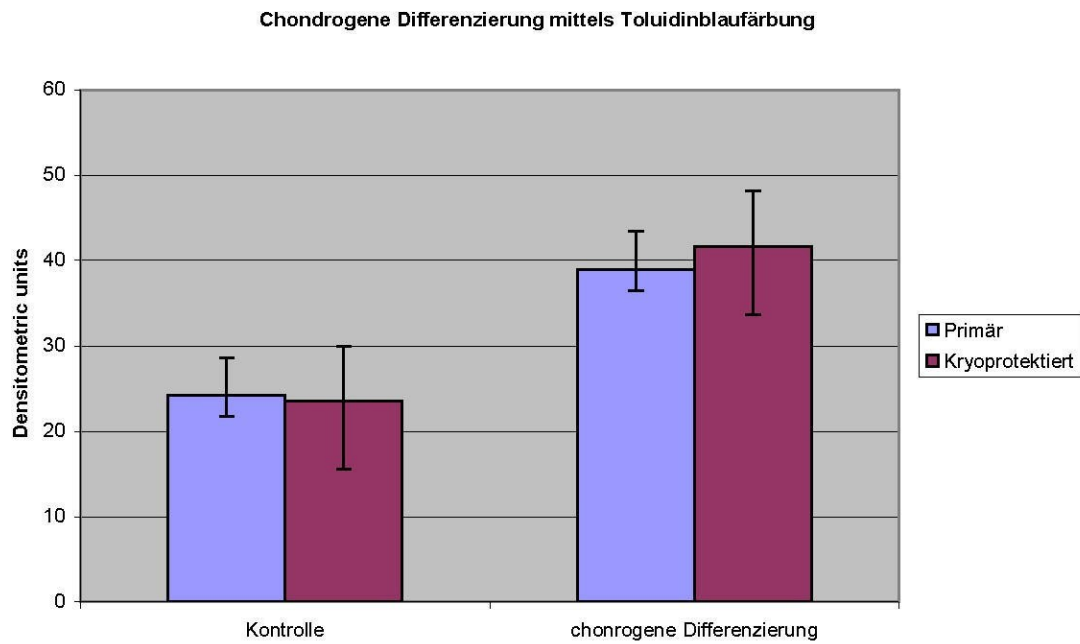
Das chondrogene Differenzierungspotential der Zellen konnte sowohl histologisch, als auch molekularbiologisch dargestellt werden ( $n = 5$ ).

Es wurden zwei Färbemethoden angewendet, zum einen wurde der positive Nachweis mit Hilfe der Alzianblaufärbung und zum anderen mit Hilfe der Toluidinblaufärbung erbracht.

Alzianblau färbt die sauren Mukopolysaccharide hellblau, in der Gegenfärbung mit Kernechtrot wurden die Zellkerne rot dargestellt.

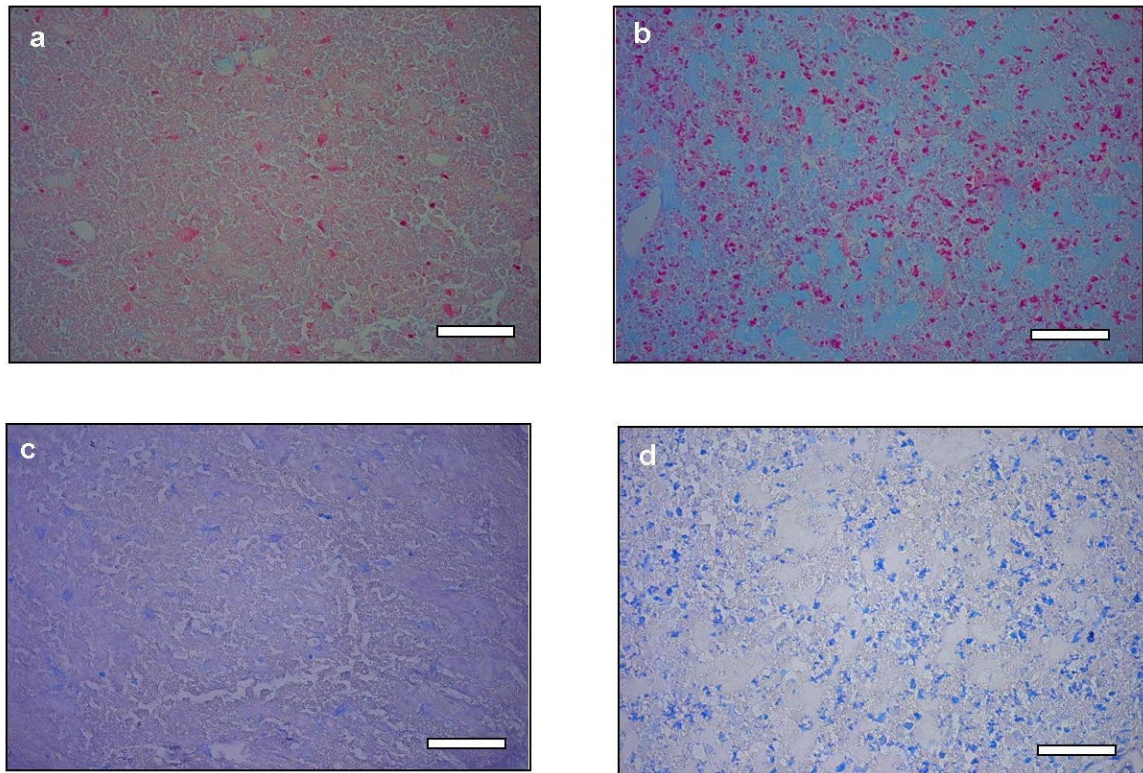
Die chondrogen differenzierten Zellen zeigen einige blau gefärbte Areale, die sich im Interstitium befinden. Hierbei handelt es sich um die Polysaccharide, die im Gegensatz zur Kontrolle nur nach chondrogener Differenzierungsinduktion detektierbar sind. In der Kontrolle können hingegen keine blauen Areale detektiert werden.

Mittels der Toluidinblaufärbung konnten die o.g. Befunde bestätigt werden. Bei dieser Färbung handelt es sich um eine spezifische Knorpelfärbung, die sich durch Blaufärbung der hyalinen Knorpelsubstanz auszeichnet. Die Kontrolle zeigte keine Blaufärbung, sondern stellte sich als graue amorphe Masse dar. Zur Kontrolle des Färbergebnisses wurde ein histologischer Schnitt einer Rattentrachea angefertigt und mitgefärbt. Die quantitative Ermittlung der Befunde erfolgte auf der Grundlage einer densitometrischen Analyse. Unter Kontrollbedingungen wurde ein Grauwert von  $24,2 \pm 4,4$  densitometric units (primäre Zellen) und  $23,5 \pm 6,5$  densitometric units (kryoprotektierte Zellen) ermittelt. Nach vorangegangener Knorpeldifferenzierung wurde ein Grauwert von  $39 \pm 2,5$  (primäre Zellen) ( $p < 0,001$ ) und  $41,6 \pm 7,9$  densitometric units (kryoprotektierte Zellen) ( $p < 0,001$ ) ermittelt.



**Abb. 34 : chondrogene Differenzierung mittels Toudinblaufärbung**  
Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme einer densitometrischen Messung, d.h. Grauwertbestimmung (n = 5)





**Abb. 35 : Chondrogene Differenzierung mittels Alzianblau- und Toluidinblaufärbung**

Nachweis saurer Mukopolysaccharide, als Nachweis der chondrogenen Differenzierung Kontrolle im Standardmedium; Alzianblau gefärbt, Gegenfärbung: Zellkerne mittels Kernechtrot, es zeigt sich eine rosa gefärbte Masse

- b) Chondrogen Differenziert; Alzianblau gefärbt; Gegenfärbung: Kernechtrot, deutliche Rotfärbung der Zellkerne, umgeben von blaugefärbten Arealen, den sauren Mukopolysacchariden
- c) Kontrolle im Standardmedium ; Toluidinblaufärbung, graue amorphe Masse
- d) Chondrogen Differenziert; Toluidinblaufärbung, die differenzierten Zellen stellen sich kräftig blau dar (n = 5)

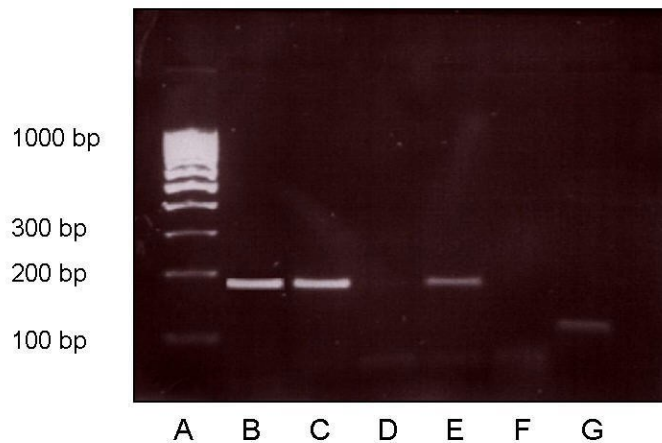
### **3.10.3.2. Immunhistochemische Färbung mit Aggrecan zum Knorpelnachweis**

Aggrecan dient dem spezifischen Knorpelnachweis. Die mit dem Aggrecan-Antikörper inkubierten Zellen zeigten nur eine geringe Fluoreszenz. Da es sich bei den zu untersuchenden Zellen nicht um Zellen handelte die im chondrogenen Medium kultiviert wurden. Um die eMSC in ihrem Differenzierungsverhalten besser beurteilen zu können, sollten die undifferenzierten Zellen auch auf jeden Fall, hinsichtlich einer Expression von Aggrecan, untersucht werden.

### **3.10.3.3. Ermittlung der chondrogenen Differenzierung mittels RT-PCR**

Neben der histologischen Untersuchung der Knorpeldifferenzierung wurde das chondrogene Differenzierungspotential auch mittels RT-PCR Analyse durchgeführt.

Unter Verwendung spezifischer Primer für Kollagen II und Aggrecan konnten in der differenzierten Zellen Transkripte sowohl für Kollagen II als auch Aggrecan nachgewiesen werden. Als housekeeping Gen wurde das in allen Zellen konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Actin herangezogen.  $\beta$ -Actin konnte deshalb sowohl in den Kontroll- als auch in den Differenzierungsansätzen nachgewiesen werden, d.h. die Expression war unabhängig vom Differenzierungsstatus.



**Abb. 36 : Visualisierung einer RT-PCR auf einem Aggarosegel;**

Überprüfung des Vorhandenseins von  $\beta$ -Actin, Kollagen II und Aggrecan zum Nachweis der Knorpeldifferenzierung mittels RT-PCR Spur A: 100bp Marker, Spur: B+D+F undifferenzierte Zellen der Kontrollpopulation, Spur: C+E+G chondrogen differenzierte Zellen

Spur B + C:  $\beta$ -Actin

Spur D + E: Kollagen II

Spur F + G: Aggrecan

Daß Knorpelzellen Aggrecan und Kollagen II enthalten, konnte durch die elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Da die entsprechenden Banden bei der Knorpeldifferenzierung vorhanden waren, dagegen in den undifferenzierten Zellen nicht, bestätigten die PCR-Befunde, daß die chondrogene Differenzierung erfolgreich war. In differenzierten Zellen konnten Transkripte für Aggrecan und Kollagen nachgewiesen werden. Die Bande E repräsentierte die Expression von Kollagen II und die G-Bande von Aggrecan. Die Banden D und F sind die jeweiligen Kontrollen, d.h. Zellen, die nicht in chondrogenem Medium kultiviert wurden. Es konnten erwartungsgemäß keine Transkripte nachgewiesen werden.

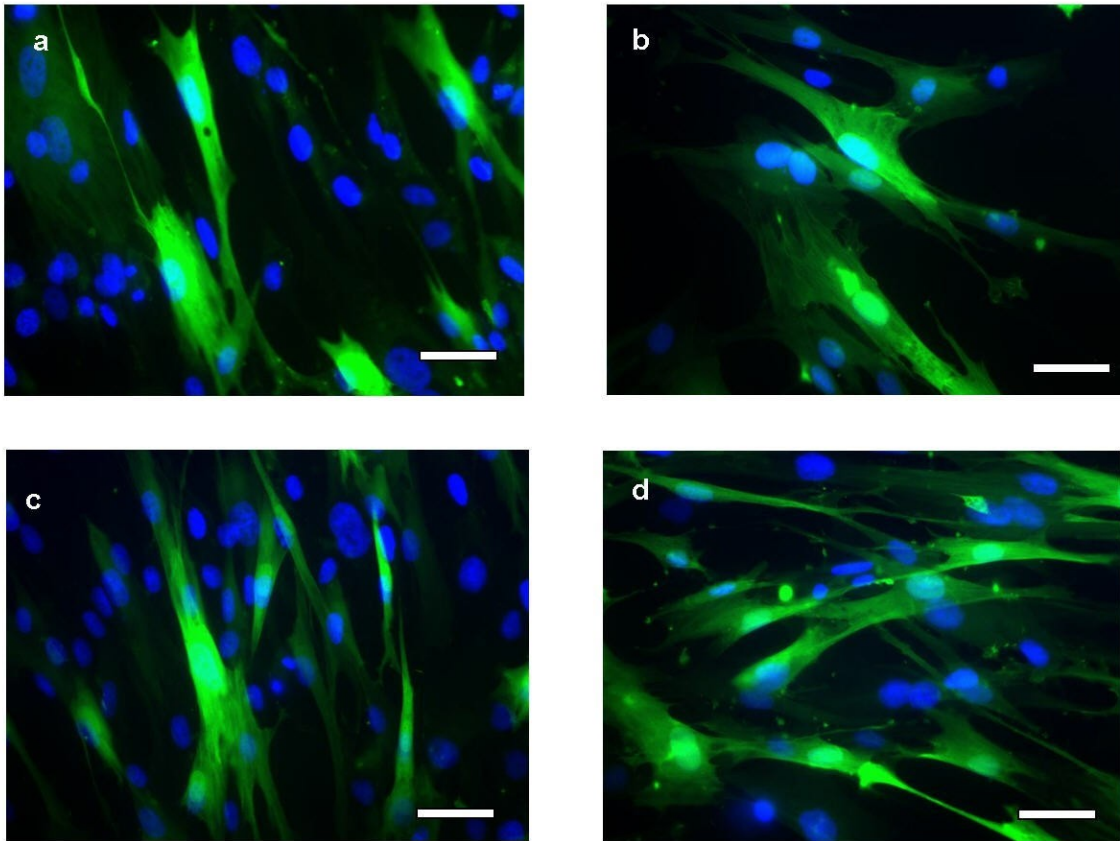
### 3.11. Vektortransduktion eines adenoviralen Vektors

Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz der MSCs, in Verbindung mit einem gentherapeutischen Vorgehen, wurden die Zellen mit einem adenoviralen Vektor der dritten Generation transduziert, der die Sequenz für GFP trug ( $n = 6$ ). Der histologische Nachweis dieser Zellen ist auch deshalb von klinischem Interesse, da nach einer Implantation der Zellen in ein geschädigtes Gewebe gezeigt werden muß, ob die Zellen auch tatsächlich im geschädigten Areal verbleiben und dort zur Regeneration beitragen. Der Vektor enthielt die Sequenz für das grün-



fluoreszierende-Protein (GFP), je nach Menge des eingesetzten Vektors (Multiplicity of infection, MOI -> Vektorpartikel pro Zelle) wurden unterschiedlich viele Zellen markiert.

Die Auszählung wurde ähnlich wie bei einer BrDU-Markierung durchgeführt. Es wurden die grünen, GFP-exprimierenden Zellen, sowie die blauen, Hoechst Dye markierten Zellkerne ausgezählt ( $n = 3$ ). Die Auszählung der blaugefärbten (Hoechst Dye) Kerne ergab die Gesamtzellpopulation. Durch Auszählung der GFP exprimierenden Zellen konnte auf die Transduktionsrate geschlossen werden. Bei einer MOI von 10, d.h. 10 Vektorpartikel pro Zelle, konnten lediglich  $13 \pm 6,6\%$  der Zellen ( $p < 0,001$ ) mit Vektor transduziert werden, daß sich bei steigender Anzahl der MOI's bei 50 auf  $17 \pm 4,2\%$  ( $p = 0,004$ ), mit 100 auf  $61,7 \pm 12,5\%$  und bei einer MOI von 200  $85 \pm 6,2\%$  steigern ließ. Das Ziel war es, möglichst viele Zellen zu markieren, um sie bei einem Einsatz in vivo fluoreszenzmikroskopisch wiederfinden zu können.

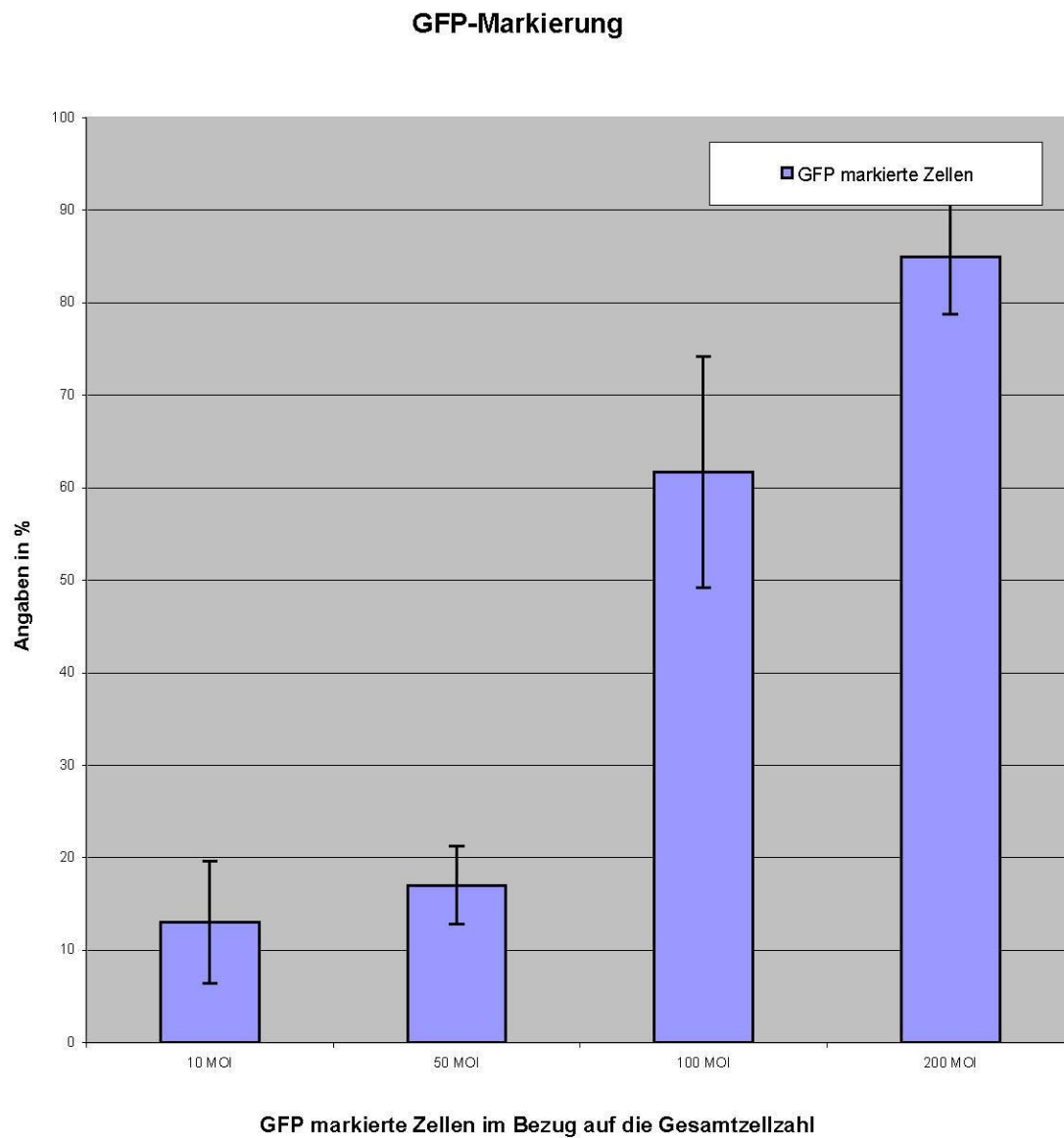


**Abb. 37 : Vektortransduktion mittels eines adenoviralen Vektors (n = 6)**

Die GFP-markierten Zellen stellen sich grün dar, die Zellkerne sind Hoechst dye (blau) gefärbt, mit steigender MOI kann der Anteil der GFP-exprimierenden Zellen deutlich gesteigert werden, bei den unmarkierten Zellen, ist nur der Zellkern sichtbar.

- a) 10 MOI,
- b) 50 MOI,
- c) 100 MOI,
- d) 200 MOI

Balken entspricht 30  $\mu$ m



**Abb. 38 : GFP – Markierung (n = 6)**

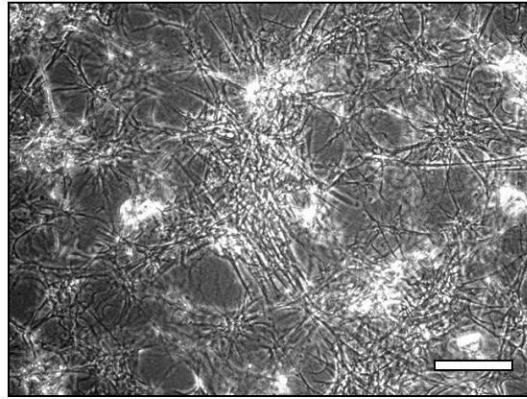
Mit zunehmender MOI Zahl steigt die Anzahl der GFP markierten Zellen an der mittels Hoechst dye ermittelten Gesamtzellzahl,

### 3.12. Kultivierung auf Trägermaterialien

Im Hinblick auf einen klinischen Einsatz der MSC's für das tissue engineering, bei Knorpel-, Knochen-, und Sehnenläsionen, erfolgte eine Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Zellen auf verschiedenen Trägermaterialien. Mit Hilfe dieser Teiluntersuchungen sollte analysiert werden, ob sich die Zellen auf den verschiedenen Trägermaterialien kultivieren lassen und ob sie sich zelltypisch differenzieren oder entwickeln. Als Trägermaterialien wurden 1. ein Kollagen-Gel, 2. Microcarrier aus Kollagenmatrix und 3. eine Fibrinmatrix gewählt.

#### 3.12.1. Kollagen-Gel

Die Kultivierung auf einem Kollagen-Gel zeigte, daß sich MSC's im Gel ähnlich verhalten wie auf einer herkömmlichen Kulturschale. Allerdings ist das Wachstumsverhalten in der 3D-Matrix viel komplexer. Die Zellen waren anfangs abgerundet und bildeten recht schnell Zellfortsätze aus, um ihre Zell-Zell-Kontakte herzustellen. Sie produzierten somit ein dreidimensionales Netzwerk. Im Trägermaterial fand ebenfalls Proliferation statt, die zu einem deutlich dichteren Netzwerk führte, je länger die Zellen kultiviert wurden. Die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes war nur bei der Kultivierung in diesem Gel sichtbar, bei einer Kultivierung, die lediglich in einer Schale ohne Gel stattfand, wurde eine solche Netzwerkbildung nicht beobachtet ( $n = 6$ ). In einer beheizbaren Vitalbeobachtungskammer (Zeiss / Göttingen) wurden die Zellen im Gel über einen Zeitraum 24 Stunden beobachtet. Bereits nach sechs Stunden wurden erste Zellfortsätze sichtbar. Nach 12 Stunden hatten sich bereits die ersten Zell-Zell-Verbindungen entwickelt und erste kleine Netzwerke waren entstanden. Nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen wurde die Kultur aus Konfluenzgründen beendet. Es konnte eine komplexe Netzwerkbildung beobachtet werden.

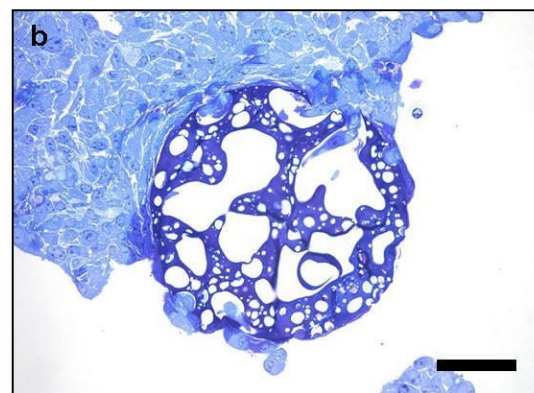
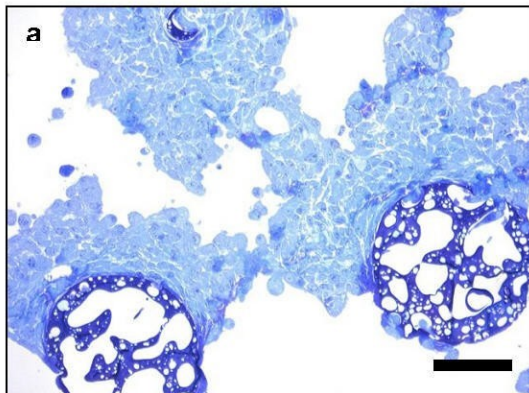


**Abb. 39 : Zellen im Kollagen Gel nach 2 Tagen**

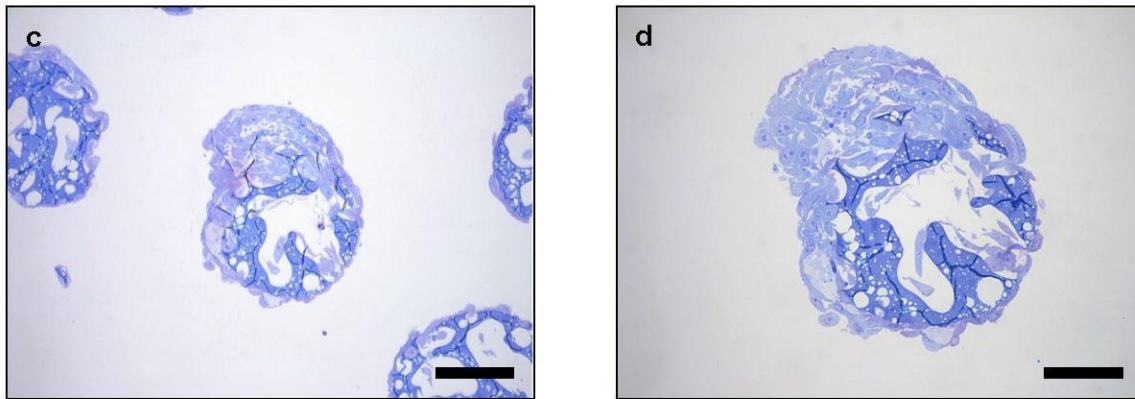
Anordnung in 3D-Formation mit deutlicher Vernetzung 100x ; Balken entspricht 90  $\mu\text{m}$  (n = 6)

### 3.12.2. Microcarrier aus Kollagenmatrix

Bei den Microcarriern (MC), Cultispheres der (Fa. Percell, Astorp / Schweden) handelt es sich um dreidimensionale, poröse Mikrosphären aus einer Kollagenmatrix mit einem Durchmesser von 150 – 200  $\mu\text{m}$ . Aufgrund ihrer Struktur bieten sie den Zellen sowohl auf der Oberfläche, als auch im Inneren die Möglichkeit, sich anzuheften. Die Zellen siedelten sich zunächst auf der Oberfläche der Microcarrier an und konnten nach einem Tag bereits in den Nischen im Inneren der Microcarrier detektiert werden (Abb. 40). Die Stammzellen wurden über drei Wochen auf den Microcarriern kultiviert. Nach der anschließenden Plattierung der mit Zellen besiedelten Microcarrier auf einer unbeschichteten Schale, wanderten die Zellen von dem Trägermaterial ab, um sich wieder auf dem Schalenboden anzusiedeln. Dort zeigten sie ein normales Wachstums- und Proliferationsverhalten (n = 4).







**Abb. 40 : Zellen auf Microcarriern im Semidünnschnitt**

a+b) Zellen auf MC nach 4 h,

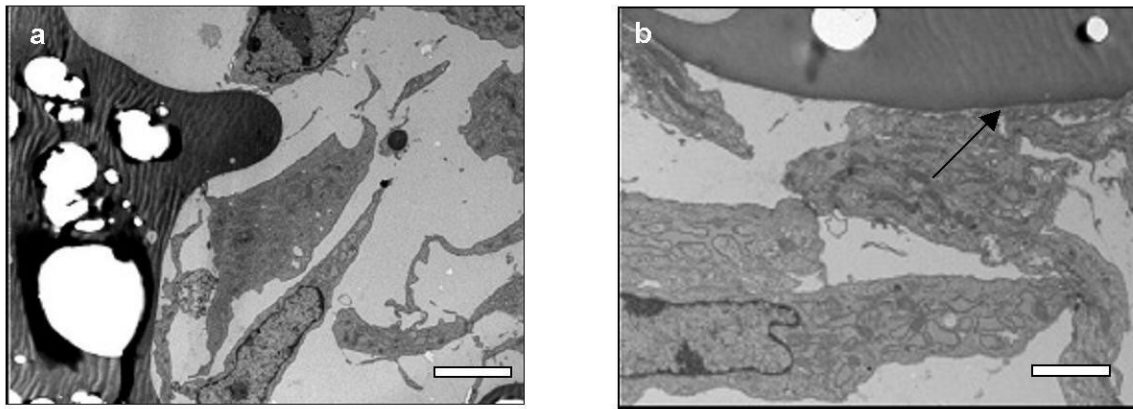
c+d) Zellen nach 26 h auf MC bei jeweils 25x und 40x Vergrößerung

a+c) Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ ; b+d) Balken entspricht 150  $\mu\text{m}$  (n = 4)

Im Semidünnschnitt nach Methylenblaufärbung konnten nach 4 Stunden die meisten Zellen auf der Oberfläche gefunden werden, vereinzelte Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt den Weg ins Innere des Microcarriers gefunden. Nach 26 Stunden besiedelten die Zellen sowohl die Außenfläche des MC, als auch die inneren Poren, so daß sämtliche Nischen mit Zellen ausgefüllt waren.

Diese Befunde konnten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestätigt werden.

Die Adhäsion der Zellen, sowohl auf der Oberfläche, als auch in den inneren Poren, ist äquivalent zu den Befunden die bereits im Semidünnschnitt ermittelt werden konnten. Die Zellen, die sich im Innern des Microcarriers befanden, zeigten einen guten Zellerhalt (Abb. 41 a). Im Semidünnschnitt zeigten die Zellen eine typische Zellmorphologie. Deutlich sichtbar wurde der Zellkern, der sich durch eine Kernmembran von der übrigen Zelle abgrenzte. Darüber hinaus konnten auch weitere Zellorganellen, wie Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum deutlich dargestellt werden. Der Zellerhalt im Innern und Äußeren des Microcarriers war identisch. Die Zellen, die dem Microcarrier auf der Außenhülle anlagen, streckten sich in die Länge. Die Zellen im Innern des Microcarriers, die sich in seinen Nischen festgesetzt hatten, paßten sich in ihrer Form der Nische an. So konnten die Zellen eine möglichst hohe Oberflächenadhäsion erlangen. Es konnten nur vereinzelt apoptotische Zellen detektiert werden. Auch elektronenmikroskopisch konnte im Ultradünnschnitt dargestellt werden, daß die Zellen eine Affinität zur Oberfläche und Zell-Zell-Kontakte ausbildeten (Abb. 41 b).



**Abb. 41 : Zellen in einem Microcarrier; Elektronenmikroskopie eines Ultradünnschnittes**

a) Zellen im Innern eines Microcarrieres nach 26 Stunden 3000x, Balken entspricht 25  $\mu\text{m}$

b) Zellen auf der Außenfläche 7000x; Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$

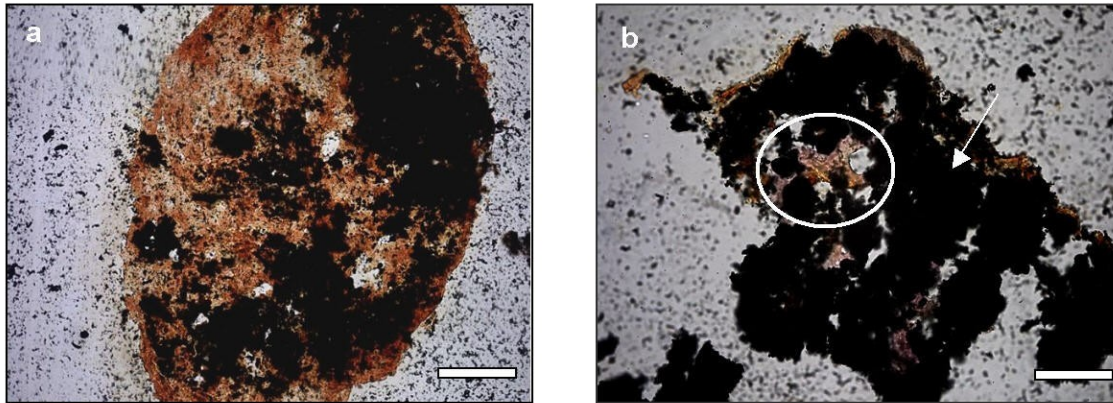
Weißer Pfeil: Microcarrier, schwarzer Pfeil: MSC die von Außen dem MC anliegt (n = 4)

### 3.12.3. Kultivierung der eMSC auf Microcarriern in einer Rotationskultur

Im Hinblick auf den Einsatz von eMSC im Tissue Engineering, beispielsweise zur Regeneration von Knochendefekten, wurden die eMSC mit den Microcarriern in einer Rotationskultur konfrontiert. Unter Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium wurden die Zellen unter diesen Bedingungen über einen Zeitraum von 3 Wochen kultiviert. Diese dreidimensionale Zellkulturform simuliert die Schwerelosigkeit und ermöglicht die Ernährung der Zellen von allen Seiten.

Während dieser Kultivierungsdauer differenzierten die Zellen in die osteogene Richtung und saßen fest auf der Oberfläche und in den Poren der MC. Nach Abschluß der Kultivierung wurden diese Zellen, die adhären auf den MC saßen, mit diesen fixiert und in Tissue Tec eingebettet. Anschließend wurden Kryostatschnitte angefertigt, die mit einer Van-Kossa-Färbung angefärbt wurden. Es konnten schwarze Kalzifizierungsprodukte auf den Microcarriern nachgewiesen werden. Der MC selbst wurde, mit der Gegenfärbung Kernechtrot, gefärbt. Zellen mit beginnender Kalzifizierung stellten sich braun dar (Abb. 42) (n = 3).



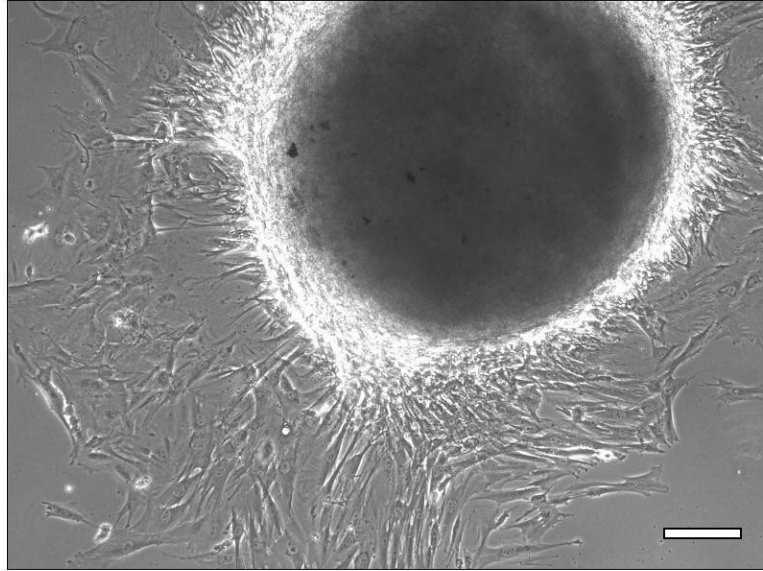


**Abb. 42 : Rotationskultur mit eMSC auf Microcarriern in der osteogenen Differenzierung**

- a) Die eMSC stellen sich braunefärbt dar, ihre Kalzifizierungsprodukte bilden schwarze Präzipitate.  
 b) Vereinzelt kann die Struktur des Microcarriers als rötlicher Hintergrund erkannt werden (eingekreist), auf diesem befinden sich die Zellen.  
 Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$  ( $n = 3$ ).

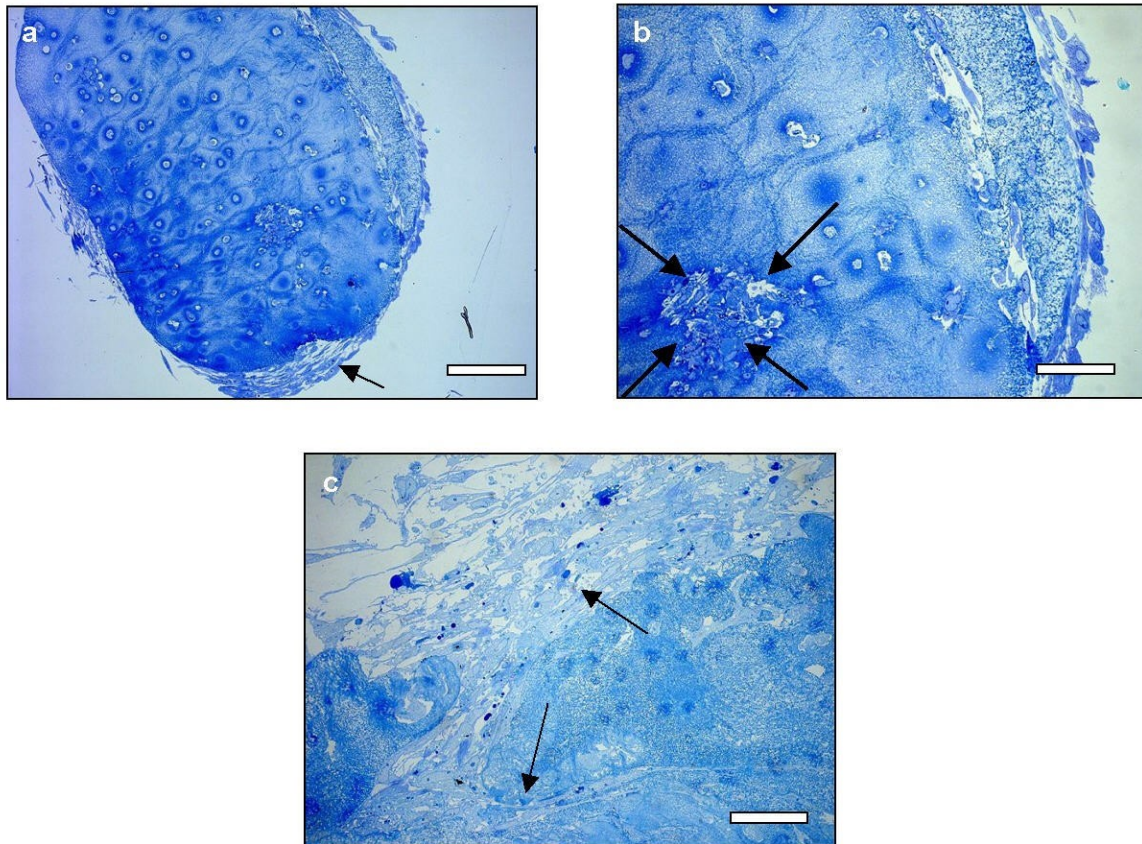
#### 3.12.4. Kultivierung der eMSC auf einer Fibrinmatrix

Ein weiteres mögliches Trägermaterial für den Einsatz im Tissue engineering stellt eine Fibrinmatrix dar, die aus einem Fibrinkleber gefertigt wurde. Zur Kultivierung der Zellen auf einer solchen Fibrinmatrix, wurden die Zellen in den Gewebekleber (Tissucol, Baxter) appliziert, der nach Abwurf in den Puffer Fibrinkügelchen bildete. Die Zellen wurden auf der Fibrinmatrix über 10 und 20 Tage kultiviert, danach fixiert und für die Elektronenmikroskopie eingebettet. Als Vitalitätstest der Zellen nach Kultivierung auf den Microcarriern wurden diese auf einer unbeschichteten Petrischale ausplattiert. Ähnlich wie bei den besiedelten Microcarriern konnte beobachtet werden, daß die Zellen von dem Fibrinbead abwanderten, sich teilten und wieder MSC-typische Morphologien annahmen (Abb. 43) ( $n = 5$ ).

**Abb. 43 : Fibrinbead in der Vitalbeobachtung**

Abwandernde eMSC von einem Fibrinbead, vorab wurden die Zellen auf bzw. in diesem Trägermaterial 20 Tage kultiviert, die Zellen wandern nach Plattierung von diesem ab, da ihnen eine Kulturschale als Kultivierungsoberfläche angeboten wurde; Balken entspricht 90  $\mu\text{m}$  (n = 5)

Im Semidünnschnitt wurde deutlich, daß sich die Mehrheit der Zellen, aufgrund der Kompaktheit der Beads, auf der Oberfläche des Beads befand. Dagegen konnten nur wenige Zellen im Inneren nachgewiesen werden. Sofern sich jedoch ein Spaltraum innerhalb des Fibrinbeads ausbildete, konnten sich die Zellen auch dort ansiedeln und sich in das Trägermaterial integrieren. Insgesamt wiesen die Zellen regelrechte Morphologien auf und zeigten keinerlei Degenerationserscheinungen (Abb. 44).



**Abb. 44 : Semidünnschnitt eines Fibrinbeads der mit Zellen besiedelt ist**

Nach 10tägiger Kultivierung der Zellen auf einer 100 mm mit Polyheme beschichteten Falconschale, im Standardmedium (n = 5)

- a) Fibrinbead bei 100x Vergrößerung, Zellen sind adhaerent auf dem Bead (Zellen: gelber Pfeil); Balken entspricht 220  $\mu$ m
- b) Bei höherer Vergrößerung 250x sind auch vereinzelt Zellen im Inneren des Beads (Pfeile) zu erkennen, aber auch eine Zellanhäufung in einer Vakuole im Inneren des Beads siehe Pfeile; Balken entspricht 150  $\mu$ m
- c) Bei 400x, Innen und Außen kann der gute Zellerhalt detektiert werden; Balken entspricht 100  $\mu$ m

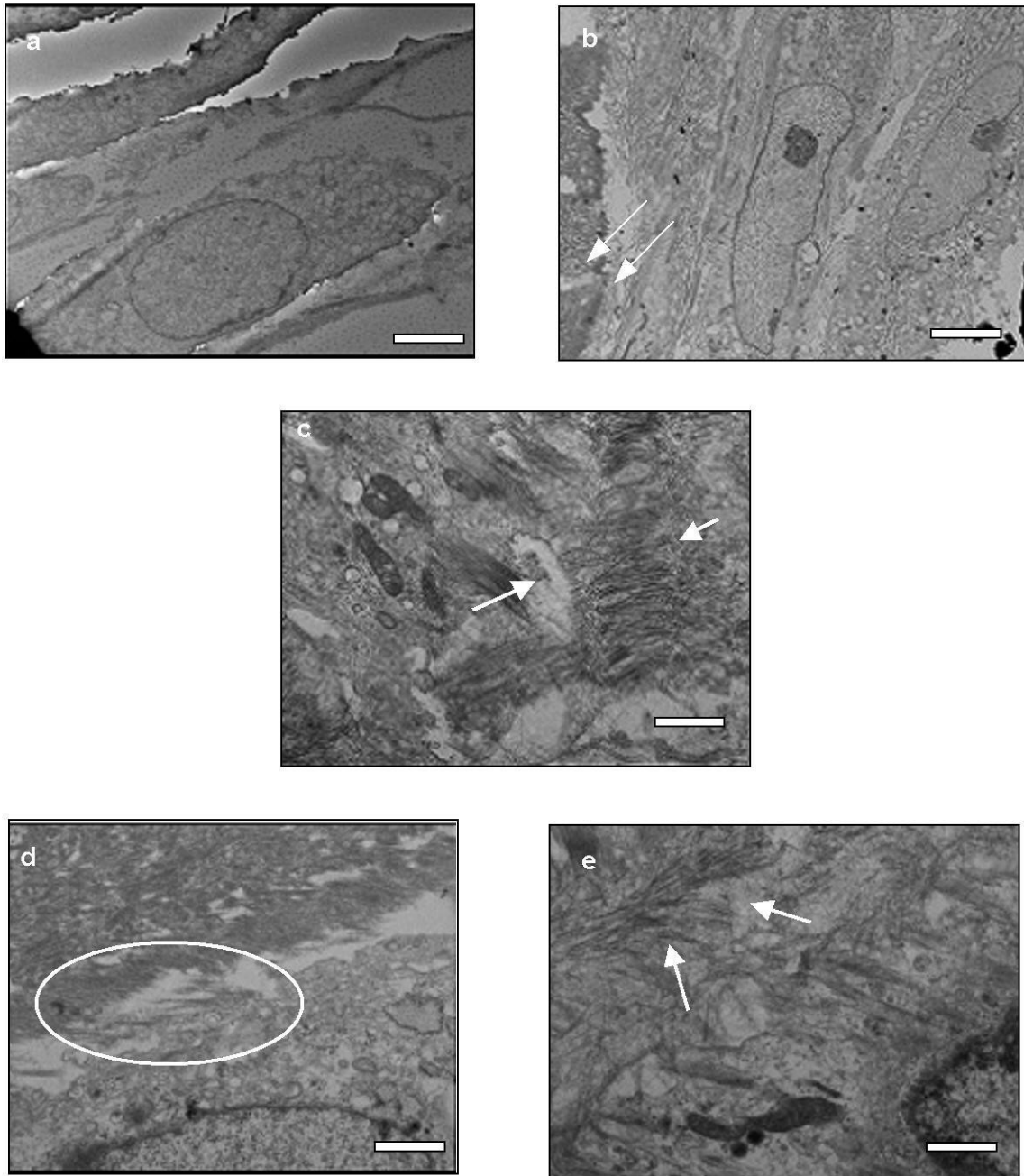
Mit Hilfe der ultrastrukturellen Darstellung (Elektronenmikroskopie) konnte die gut erhaltene Morphologie der eMSC auf der Fibrinmatrix bestätigt werden.

Zu einem späteren Zeitabschnitt, nach 20 Tagen, gingen die Zellen mit ihrer Matrix eine Wechselbeziehung ein. Es schien, daß die Extrazellulärmatrix (EZM) das Fibrin mobilisierte und diese beiden Komponenten, EZM der Zellen und Fibrin, eine stabile Bindung eingingen (Abb. 45 c, d, e). An diesen Stellen, an denen eine zahnartige Verbindung entstand, wurde eine zielgerichtete Ausrichtung der Fibrinmatrix deutlich (Abb. 45 c und e). Hier verdichtete sich die Trägermatrix aufgrund der entstanden stabilen Bindung mit der EZM der Zellen. Bei der elektronenmikroskopischen Aufarbeitung der Proben entstanden Artefakte aufgrund der Gewebszerreißung.

Diese ließen sehr gut erkennen, wie gut diese Extrazellularmatrix-Fibrinkleber-Interaktion aufgebaut ist (Abb. 45 d, in den umkreisten Strukturen).

In diesem Stadium (20 Tage) konnte sogar die Ausbildung von Kollagenfibrillen dargestellt werden (Abb. 45 e).





**Abb. 45 : Elektronenmikroskopie von eMSC in Fibrinbeads**

- a) Fibrinbeads mit MSC nach 10 Tagen, im Inneren des Beads, 3000x; Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$   
 b) Fibrinbeads mit MSC nach 10 Tagen auf der Außenseite des Beads 3000x Bild; Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$  Pfeil  $\rightarrow$  Fibrin  
 c-e) Fibrinbeads mit MSC nach 20 Tagen, im Inneren des Beads mit deutliche sichtbarer Interaktion zwischen den Zellen und der Fibrinmatrix 12000x, Ausbildung Kollagen-ähnlicher Fibrillen (Pfeil);  
 d) Zell-Matrix-Interaktion (eingekreist; oberer linker Teil Fibrin, unterer rechter Teil Zelle)  
 Balken entspricht 3  $\mu\text{m}$  (n = 5)

### 3.13. Klinisch-therapeutischer Einsatz der eMSC

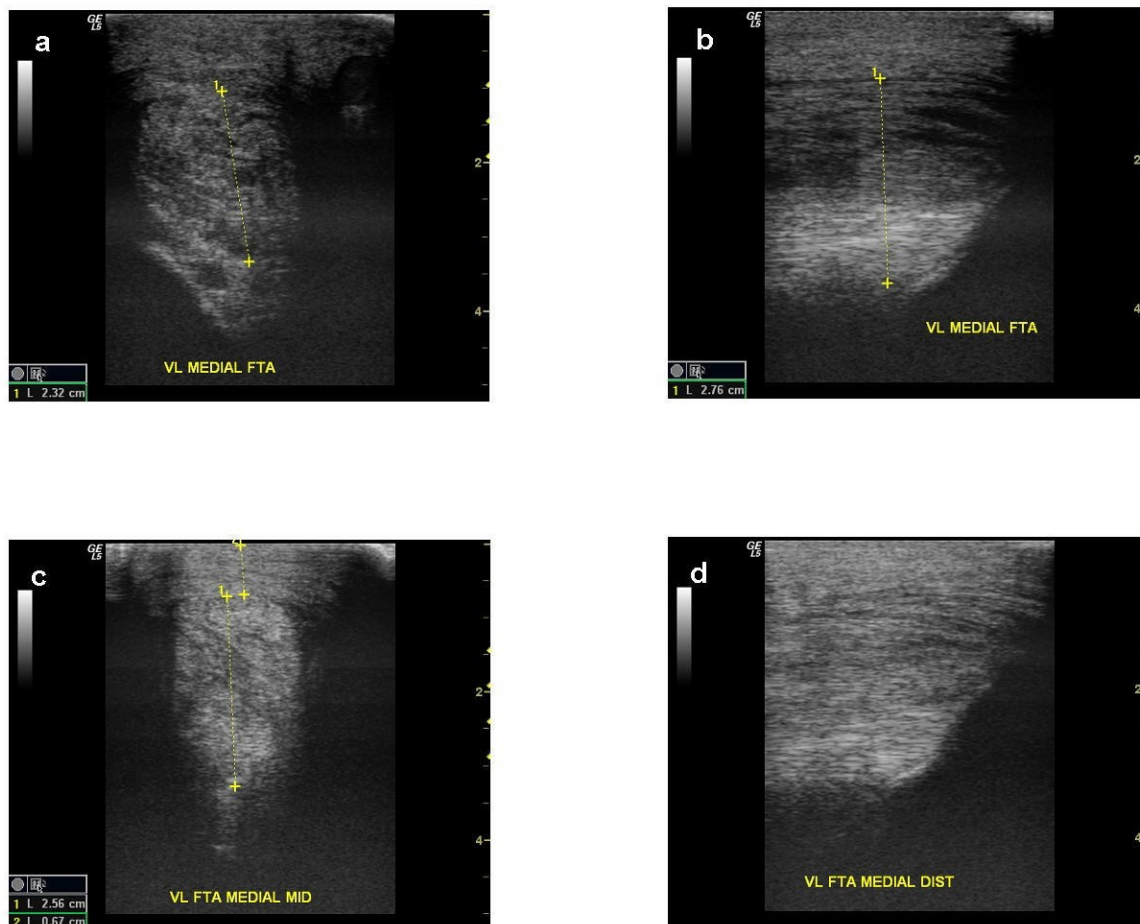
Um den therapeutischen Erfolg der eMSC's tatsächlich bei entsprechenden Läsionen zu testen, wurden 32 Pferde, mit den von ihnen gewonnenen, autologen Stammzellen behandelt, die im Labor aufbereitet und expandiert worden waren. Die Stammzelltherapie wurde bei verschiedenen Indikationen, bei Läsionen der oberflächlichen und der tiefen Beugesehne, sowie bei Läsionen des Fesselträgerursprungs und des Fesselträgeransatzes, angewandt. Bei der Mehrzahl der Defekte war ein chronisches bzw. längerfristiges Leiden (Per definitionem liegt ein chronischer Schmerz oder eine chronische Erkrankung spätestens dann vor, wenn ein Patient länger als sechs Monate anhaltend oder wiederkehrend darunter leidet) ein Grund der Behandlung. Sie wurden auch bei akuten Verletzungen der genannten Strukturen eingesetzt. Bei den behandelten Pferden handelte es sich sowohl um Freizeit-, als auch um Sportpferde. Es wurden ausschließlich Warmblutpferde aus unterschiedlichen Zuchtgebieten behandelt.

Hat sich der behandelnde Tierarzt für die Stammzelltherapie entschieden, wurden den Pferden 25 ml Knochenmark aus dem Sternum entnommen. Nach Aufbereitung im Zellkulturlabor des Institutes I für Anatomie der Universität zu Köln wurden je nach Defektgröße zwischen 8 Millionen und 12 Millionen angezüchtet und anschließend in die defekte Sehne des zu behandelnden Pferdes reimplantiert. Die Pferde erhielten nach dieser Behandlung für 6-7 Tage Boxenruhe und wurden anschließend für 3 Monate im Schritt, mit einem wöchentlichen Anstieg der Schrittphase um 5 Minuten, bewegt.

Eine adspektorische, palpatorische und sonographische Nachuntersuchung wurde in den Abständen von 6 Wochen, 3 Monaten und 6 Monaten durchgeführt.

Die Untersuchungen ergaben, daß eine zügige Regeneration (ohne ultrasonographisch sichtbaren Läsionen) des gesamten Defektes bereits nach drei Monaten zu verzeichnen war. Die Pferde konnten zu diesem Zeitpunkt bereits leicht belastet werden. Sie zeigten weder vermehrte Wärme noch eine Umfangsvermehrung an der ursprünglichen Lokalisation des Defektes, des weiteren konnte bei der Palpation keine Schmerzreaktion ausgelöst werden. Im Schritt und im Trab konnten keine Lahmheitszeichen beobachtet werden. Ultrasonographisch konnte belegt werden, daß vor der Behandlung multiple Defekte sowohl im Sehnenquer- als auch im Längsschnitt vorhanden waren (Abb. 46 a+b). Nach der

Behandlung und einem Nachuntersuchungszeitraum von drei Monaten konnten keine Defekte mehr detektiert werden, die Parallelität der Sehnenfasern war wieder vollständig hergestellt. Das Sehngewebe erschien ultrasonographisch homogen und ohne Narbenbildung, was auf eine vollständige Regeneration des Sehngewebes schließen ließ.



**Abb. 46 : Ultrasonographische Darstellung eines Fesselträgeransatzes (FTA) vor und nach Stammzellinjektion**

- a) Verletzung eines FTA vor der Stammzellbehandlung
- b) Verletzung eines FTA vor der Stammzellbehandlung longitudinal
- c) Verletzung des FTA 3 Monate nach der Stammzellbehandlung
- d) Verletzung des FTA 3 Monate nach der Stammzellbehandlung longitudinal



## 4. Diskussion

### 4.1. Zielsetzung

Die Zielsetzung für diese Arbeit war die Erarbeitung eines Protokolls zur Isolation und Expansion von mesenchymalen Stammzellen aus dem Sternalpunktat von Pferden. Das Medium, das zur ersten Anreicherung genutzt wurde, stammt aus Voruntersuchungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen (Klinz et al. 2005; Arnhold et al. 2006b) in denen  $\alpha$ MEM Basalmedium mit einem Serumanteil von 20% Kälberserum beschrieben ist.

Bevor diese aus dem Sternum gewonnen Zellen das Zellkulturlabor erreichen, müssen sie vom Entnahmeort (der teilweise mehrere Hundert Kilometer entfernt war) zum Labor transportiert werden. Deshalb mußten Untersuchungen zur Vitalität der Zellen bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen durchgeführt werden.

Um das Selbsterneuerungspotential der Zellen, ein typisches Charakteristikum von Stammzellen zu testen, wurden CFU's in niedriger Zellbesatzdichte angelegt. Diese sollten anschließend quantifiziert werden (Walker et al. 1974; Delorme and Charbord 2007; Lennon et al. 2001; Delorme and Charbord 2007).

Ein weiterer Gegenstand der Untersuchung war die Beurteilung der Kryokonservierbarkeit der Zellen in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ . Diese Kryokonservierung sollten die Zellen ohne Beeinträchtigung ihrer Morphologie und ihrer Proliferationsfähigkeit überstehen. Sie wurden dazu nach dem Einfrieren wieder aufgetaut und mit nativen Zellen parallel kultiviert und verglichen. Die Morphologie wurde phasenkontrastmikroskopisch überwacht, die Proliferationsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe einer BrDU-Markierung (Forster et al. 1989) und dem Antikörper Ki 67 (Proliferationsmarker) (Schwartz et al. 1986; Slettedal et al. 2008a) ermittelt. Die Ergebnisse der kryokonservierten Zellen wurden im Anschluß mit den Ergebnissen der nativ geführten Zellen verglichen.

Um das Proliferationsverhalten der Zellen genauer zu untersuchen, wurden die Zellen sowohl unter Standardbedingungen, als auch unter Sauerstoffreduktion kultiviert. Da bekanntermaßen sowohl im Knochenmark, als auch in Sehnen- und Knorpelgewebe eine niedrigere Sauerstoffspannung als im übrigen Gewebe herrscht, war dies ein wesentlicher Versuchsansatz, um die Auswirkung der Sauerstoffreduktion der Zellen in vitro zu beurteilen, bzw. um typische physiologische Kulturbedingungen zu erzielen (Lennon et al. 2001).

Um das Wachstumsverhalten der Zellen in Kultur zu untersuchen, sollten die Zellen über mehrere Passagen kultiviert und kontinuierlich beurteilt werden. In diesem Zusammenhang wurden die besten Kulturbedingungen ausgetestet und dabei mehrere Medien und Seren eingesetzt. Als Basalmedien wurden  $\alpha$ MEM und DMEM mit einem niedrigen Glucosegehalt getestet. Diese Medien wurden in Verbindung mit Pferdeserum, Fohlenserum, sowie fetalen Kälberserum getestet. Die Zellen wurden zur Beurteilung des Einflusses der Kulturmedien auf die Morphologie, das Proliferationsverhalten sowie das Erreichen bestimmter Passagenzahlen untersucht und anschließend das geeignetste Medium für die Kultivierung ausgesucht.

Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz, wurden die Zellen hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens untersucht (Gao et al. 2004). Um einen Gewebsverschluß zu erzielen mußten die Zellen den Defekt überqueren, um erneute Zell-Zell-Kontakte mit Zellen der gegenüberliegenden Seite des Defektes zu knüpfen. Um die Migration der Zellen nicht nur in vitro sondern auch in Zukunft in vivo verfolgen zu können, wurden die Zellen mittels eines adenoviralen Vektors transduziert und die Transduktionseffizienz ermittelt (Xia et al. 2005; Duan et al. 2006; Lang et al. 2006; Piersanti et al. 2006).

Die eMSC sollten phasenkontrastmikroskopisch morphologisch und immunzytochemisch beurteilt werden. Anschließend sollte auch eine immunzytochemische Charakterisierung, mit einem spezifischen Stammzellmarker THY 1/ CD 90, durchgeführt werden. Dieser Oberflächenmarker ist auch spezifisch für andere Stammzellpopulationen (Nakamura et al. 2006; Chen-Woan et al. 1996; in 't Anker et al. 2003). Eine weitere Charakterisierung der Zellen hinsichtlich der Expression von Extrazellulärmatrixbestandteilen sollte immunzytochemisch mittels der Antikörper gegen Perlecan (Xu et al. 2008; Gomes et al. 2002; Romanenko et al. 2006) und Fibronectin (Xu et al. 2008; Chen et al. 2007; Baird et al. 1993; Delorme and Charbord 2007) untersucht werden, sowie mit  $\beta$ 1-Integrinen, das transmembranäre Protein zur Verankerung mit der Extrazellulärmatrix, dargestellt werden.

Im nächsten Schritt sollte die Pluripotenz der Zellen, sowie ihr Differenzierungspotential untersucht werden. Dazu sollten die eMSC unter Verwendung spezifischer Differenzierungsmedien in die osteogene, adipogene und

chondrogene Differenzierungsrichtung gebracht werden (Pittenger et al. 1999; Sittinger et al. 2004; Tondreau et al. 2004b). Die gewebetypischen Differenzierungen sollten anschließend mit histochemischen Verfahren bei adipogener und osteogener und mittels RT-PCR und histochemischer Verfahren bei der chondrogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer Grauwertbestimmung sollte zum Nachweis der alkalischen Phosphatase die Zunahme der Farbintensität bei osteogener Differenzierung bestimmt werden (Korkmaz et al. 2006).

Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz der eMSC, zur Regeneration größerer Gewebsläsionen, sollte eine Kultivierung der eMSC auf Trägermaterialien getestet werden. Der Einsatz synthetischer Biomaterialien, als mechanische Scaffolds, sollte für diesen Versuchsaufbau unabdingbar sein, da nur durch die mechanische Festigkeit und gleichzeitige Etablierung eines extrazellulären Mikroklimas eine zellgesteuerte Regeneration erreicht werden konnte (Farrell et al. 2006; McGuire and Scheyer 2006; Lubiowski et al. 2005).

Dazu sollten die Zellen in einer Fibrinmatrix (Mok et al. 1994), in einer spezifischen Kollagen I Matrix (Awad et al. 2000a; Kall et al. 2004) und auf dreidimensionalen Microcarriern (Campbell et al. 1993; Arnhold et al. 2006a) kultiviert werden.

Die Anwendung der synthetischen Trägermaterialien kann das Abschwimmen der Zellen aus einem großen Defekt verhindern, da diese Trägermaterialien im Empfängergewebe mit einem Gewebekleber (Tissucol) fixiert werden könnten.

Die Interaktion der MSC's mit den Trägermatrizes sollten mittels der Phasenkontrast- und der Elektronenmikroskopie beurteilt werden.

Im letzten Versuchsabschnitt wurde die tatsächliche therapeutische Einsatzmöglichkeit der Zellen untersucht. Dazu sollten die Zellen in Läsionen der Beugesehnen, sowie bei Defekten im Fesseltrageapparat eingesetzt werden.

Der Therapieerfolg sollte ultrasonographisch dargestellt werden.

#### 4.2. Kritik der Methode

Der Versuchsaufbau soll Aufschluß über die morphologischen Eigenschaften der equinen mesenchymalen Stammzellen geben.

Dazu wurden die Zellen aus dem Sternalpunktat von Pferden entnommen (Fortier et al. 1998) (Smith et al. 2003b).

In der Literatur werden auch andere Möglichkeiten der Stammzellgewinnung beschrieben, so besteht nicht nur die Möglichkeit, Stammzellen aus dem Sternalpunktat zu isolieren, sondern auch aus Fettgewebe, peripherem Blut (Koerner et al. 2006) und aus dem Beckenkamm. Allerdings, wie (Koerner et al. 2006) beschreibt, ist die Kultivierung der Stammzellen aus dem peripheren Blut nicht so erfolgreich wie es bei Zellen, die aus dem Sternalpunktat oder dem Beckenkamm (Risbud et al. 2006; Mazzini et al. 2006; Tan et al. 2005) extrahiert werden, der Fall ist. Hämatogene Stammzellen müssen auf beschichteten Schalen kultiviert werden, damit überhaupt eine Adhärenz der Zellen zu verzeichnen ist. Die Gewinnung der Zellen aus dem Fettgewebe (Moon et al. 2006; Timper et al. 2006; Kern et al. 2006) ist ebenfalls möglich, diese müssen jedoch durch Digestion isoliert werden. Aus dem Beckenkamm gewonnene Zellen lassen sich zwar gut isolieren und kultivieren, jedoch ist ihre Gewinnung mit einem wesentlich größeren Aufwand verbunden, als dies bei der Gewinnung aus dem Sternalpunktat der Fall ist. Die Zellen müssen durch eine Operation mit Eröffnung des Beckenknochens, mittels einer Knochenstanze, aus diesem entnommen werden. Dagegen erfolgt die Entnahme aus dem Sternum mittels einer Jamshidi-Nadel im Bereich der Sternalzwischenräume. Aufgrund der vereinfachten Gewinnung und der geringen Belastung für die Tiere, gegenüber der Isolation aus dem Beckenkamm, wurden die für diese Arbeit ausschließlich Zellen aus dem Sternalpunktat der Pferde gewonnen.

Nach der Entnahme werden die Zellen in einem Transportmedium,  $\alpha$ MEM, im Verhältnis 1:1 in das Labor transportiert, was immer die gleichen Voraussetzungen der zu behandelnden Zellen garantiert.

Die Kultivierung der Zellen findet in dem Standardmedium (Arnhold et al. 2006b; Klinz et al. 2005), bestehend aus  $\alpha$ MEM, mit einem Zusatz von 20% fetalem Kälberserum statt. In anderen Arbeiten (Hegewald et al. 2004b; Lennon et al. 1996; Hegewald et al. 2004b; Fortier et al. 1998) wurde beschrieben, daß die Zellen in einem Medium aus DMEM und 10% fetalem Kälberserum kultiviert wurden. Im Gegensatz zu deren Protokoll werden in der vorliegenden Arbeit die Zellen nur alle 3-4 Tage mit frischem Medium versorgt. Das Ablösen der Zellen aus der Schale erfolgte mit Accutase statt mit Trypsin – EDTA, was ein weitaus schonenderes Verfahren darstellt, da sich die Enzyme nach einiger Zeit selber inaktivieren. Es

konnte gezeigt werden, daß mittels der Accutasebehandlung die Zellen erfolgreich von der unbeschichteten Schale abgelöst werden können und daß die weiterkultivierten Zellen, im Vergleich mit mechanisch dissoziierten Zellen, keine Proliferationseinbußen aufwiesen.

In einer aufwendigen Testreihe konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, daß eine Kultivierung der eMSC in  $\alpha$ MEM mit 20% fetalem Kälberserum das geeignetste Medium für die Kultivierung der Zellen war (Pittenger et al. 1999). Zur Austestung der geeignetsten Kulturbedingungen wurden verschiedene Chargen von Seren adulter Pferde, sowie ein Fohlenserum getestet. Die Austestung der Pferdeseren wurde durchgeführt, um festzustellen, ob auch im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz eine Kultivierung mit einem Serum der gleichen Spezies möglich oder sogar besser ist. Die Nutzung des Serums der gleichen Spezies sollte diverse Probleme, die bei der Reimplantation auftreten könnten, vorab ausschließen. Im Hinblick auf den klinischen Einsatz sollte möglichst autologes bzw. allogenes Serum verwendet werden, um Entzündungsreaktionen nach einer Reimplantation zu verhindern. Da die Kultivierung von MSC mit autologem Serum bereits in der Humanmedizin Anwendung findet (Stute et al. 2004), ist die Übertragung dieser Methode auf die equinen MSC's ein sehr naheliegender Schritt. In den durchgeführten Testreihen konnte gezeigt werden, daß eine Kultivierung der Zellen in equinem Serum möglich ist und daß morphologisch keine Abweichungen von den Zellen bestehen, die in Kälberserum kultiviert wurden. Lediglich die Generationsverdopplungszeiten, sowie die Passagenzahlen weichen geringgradig gegenüber den Zellen ab, die unter Standardbedingungen, d.h. in fetalem Kälberserum, kultiviert wurden.

Zur Bestimmung des geeignetsten Serums wurden die Zellen einer Medien- und Serumtestung unterzogen. Um die Proliferationsfähigkeit zu überprüfen, wurden die Zellen auf Rasterschalen ausplattiert. Auf jeder Rasterschale wurden fünf einzelne Kästchen markiert, die zur späteren Auszählung herangezogen wurden und aus denen dann ein Mittelwert bestimmt wurde. Bei der Auszählung ergaben sich zum Teil hohe Differenzen, die sich in einer deutlichen Streuung darstellen ließen. Desweiteren wurden die Schalen erst ab einer Konfluenz von 80% passagiert. Bis diese erreicht wurde, vergingen unterschiedlich lange Zeiträume, die zum Teil über Tage differierten. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen diese Methode nicht mehr angewandt, da die Ergebnisse nicht vergleichbar waren, was an der Zellverteilung in der Schale lag. Als Methode der Wahl kam die Berechnung der

Generationsverdopplung in betracht. Diese Formel setzt die Anzahl der Zellen bei der Passage in Bezug auf die Kultivierungsdauer in Stunden.

Das autologe Serum erwies sich, im Gegensatz zu dem kommerziell erworbenen Pferdeserum, als ungünstig für die Zellen. Die Zellen proliferierten nicht, was darauf schließen läßt, daß in dem kommerziell verfügbaren Serum weitere Wachstumsfaktoren enthalten zu sein scheinen, die letztlich für eine Proliferation wichtig sind.

Zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens der Zellen mittels Ki 67, wurde die Zellen nach abgeschlossener Fixations markiert. Der Nachteil dieser Methode ist, daß es sich hierbei um eine „Momentaufnahme“ handelt, die keinen objektiven Überblick über die Zellteilung der Kultur zuläßt. In anderen Arbeiten (Schwarting et al. 1986; Slettedal et al. 2008b) wird dies nicht als Nachteil diskutiert. So visualisiert (Schwarting et al. 1986) das Zellteilungspotential von equinen Endometriumszellen.

Für die Kryokonservierung der Zellen wurde ein Protektionsmedium gewählt, das einen geringeren DMSO-Anteil aufweist, da DMSO nicht nur kryoprotektierend wirkt, sondern in höheren Konzentrationen extrem zelltoxisch ist. Außerdem kann es Einfluß auf die Differenzierung der Zellen nehmen. In den verschiedenen Publikationen (Vescovi et al. 2002; Milosevic et al. 2005) variieren sowohl die Zusammensetzung der Einfriermedien, als auch die Zellzahl pro Röhrchen. Hegewald (Hegewald et al. 2004b) verwendet ein Medium, das folgende Komponenten enthält: 10% DMEM, 10% DMSO, 80% FCS. Anschließend werden die Zellen für 24 Stunden bei -80° C und anschließend bei -196° C gekühlt.

Ein weiterer Vorteil gegenüber der von Hegewald angewandten Methode ist das Benutzen eines speziellen Einfriercontainers. Dieser ermöglicht ein schonendes Einfrieren der Zellen auf -80° C, da sich der Inhalt des Containers pro Minute um ein Grad abkühlt. Aufgrund dessen ist die Temperatur von -80° C nach 80 Minuten erreicht, und die Zellen können bereits nach dieser kurzen Zeitspanne in den flüssigen Stickstoff zur endgültigen Lagerung überführt werden. Die Methode der „sanften“ Kryokonservierung führt zu einem höheren Zellerhalt und wird für diese Versuchsreihe standardmäßig durchgeführt, da ein Teil der Zellen zur Reimplantation in die Empfängertiere bestimmt ist.

Folgt nach der Kryokonservierung ein erneutes Ausplattieren der Zellen mit darauf folgender Kultivierung, weisen die Zellen, im Vergleich zu nicht kryokonservierten Zellen, keine Abweichungen in ihren Morphologien auf.

Da für einen therapeutischen Einsatz kryokonservierte Zellen eingesetzt werden, wurden für die weiteren Untersuchungen kryokonservierte Zellen eingesetzt. So auch für die Untersuchung des Migrationsverhaltens. Mittels eines Vitalbeobachtungssystems konnte belegt werden, daß Einzelzellen aktiv in der Kultivierungsschale wanderten, um in Zell-Zell-Interaktion zu treten. Allerdings ist eine Messung der zurückgelegten Strecke der Zellen sehr aufwendig, da die Zellen in alle Richtungen zu benachbarten Zellen wandern. Es wurde daher eine Methode gewählt, bei der sichergestellt ist, daß die Zellen zielgerichtet migrieren. Um das zu erreichen, wurde die so genannte „wounded healing“ Methode (Gao et al. 2004) angewendet. Dabei wird ein Zellmonolayer bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert, anschließend wird dieser konfluente Zellrasen getrennt. Diese Zusammenhangstrennung, bei der mit Hilfe einer Pipettenspitze ein Kratzer in den Zellrasen geritzt wird, ermöglicht eine zielgerichtete Migration der Zellen zur gegenüberliegenden Seite des zellfreien Areals. Diese Methode bewies sich als gut auswertbar und vergleichbar, da nach definierten Zeitspannen der Abstand zwischen den beiden Zellfronten erfaßt werden konnte.

Die Untersuchungen zum Differenzierungspotential der eMSC's wurden grundsätzlich unter den gleichen Kulturbedingungen, wie bereits unter Standardkulturbedingungen besprochen, durchgeführt. Das Differenzierungspotential der eMSC kann anhand unterschiedlichster Methoden nachgewiesen werden. Die Standardbedingungen sind bei allen Differenzierungsansätzen dieselben, es handelt sich immer um eine Kultivierung bei 37° C und einem O<sub>2</sub>-Gehalt von 21%. Allerdings wurden die Differenzierungen nach Kultivierung in verschiedenen Medien beurteilt. Zur Induktion der osteogenen Differenzierung wurde das Protokoll von Tondreau (Tondreau et al. 2004b) angewandt, da mit diesem Protokoll ausreichend Erfahrung für die Kultivierung von MSC's, der Ratte und des Menschen, gesammelt werden konnte.

Weitere Arbeiten (Andrades et al. 1999 ; Mizuno et al. 2000; Walsh et al. 2003; de Jong et al. 2004) beschreiben die Ansätze unterschiedlicher Medien zur Einleitung einer osteogenen Differenzierung.

Diese Medien unterschieden sich sowohl im FCS-Gehalt 0,5% (Andrades et al. 1999) bis 10% und bezüglich der zugesetzten Differenzierungsfaktoren, wie bFGF, rHOP, rHBMB (Andrades et al. 1999); IGF-I (Walsh et al. 2003); Vitamin D3 und



Parathyroidhormon (PTH) (Sammons et al. 2004) Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat (Tondreau et al. 2004b).

Bei allen Differenzierungsansätzen für die osteogene Richtung wird jedoch Dexamethason supplementiert.

Sowohl der Nachweis der ALP mit einer NBT-Färbung als auch die Van-Kossa-Färbung zum Kalzifizierungsnachweis sind anerkannte Nachweismethoden der osteogenen Differenzierung (Andrades et al. 1999; Mizuno et al. 2000; Walsh et al. 2003; de Jong et al. 2004). Der ALP-Gehalt der differenzierten Zellen konnte mittels densitometrischer Messung quantifiziert werden. In dieser Messung wurden die ermittelten Grauwerte der Proben mit den unbehandelten Kontrollen verglichen. Vorab wird ein Weißabgleich durchgeführt, damit die möglicherweise unterschiedlichen Hintergründe der verschiedenen Färbungen nicht mit in die Messung einfließen. Je höher der Grauwert dieser Auswertung ist, desto stärker ist die ALP-Färbung, was auf eine starke osteogene Differenzierung schließen läßt. Man würde erwarten, daß der Wert der undifferenzierten Zellen deutlich niedriger ausfällt. Der relativ hohe Grauwert in den Kontrollen, läßt sich allerdings durch die Gegenfärbung der Zellen mit Kernechtrot erklären, womit die Zellkerne und teilweise auch die Zellkörper kontrastiert bzw. gegengefärbt werden. Diese Rosafärbung ergibt natürlich bei einer Schwarzweiß-Aufnahme ebenfalls einen Grauwert, der z.B. in der Zahl 18,1 densitometric Units zum Ausdruck kommt. Solche histologischen Ergebnisse, die aufgrund von verschiedenen Entwicklungs- und Inkubationszeiten mit Hilfe der Densitometrie ausgewertet werden, geraten häufig in die Kritik. Wurden die Zeiten allerdings exakt eingehalten, ist die Methode zuverlässig. Korkmaz (Korkmaz et al. 2006) hat in seinen Untersuchungen die Methode etabliert und sie ist mittlerweile als solche anerkannt.

Bei der Van-Kossa-Färbung treten schwarz gefärbte Cluster deutlich hervor. Diese Präzipitate sind Kalzifizierungsprodukte, die im Zuge der osteogenen Differenzierung entstehen und durch das Silbernitrat, als Bestandteil der Färbelösung, stark hervorgehoben werden.

Für die chondrogene Differenzierungsrichtung werden gut ausgebildete Zell-Zell-Kontakte benötigt. Um eine solch starke Zell-Zell-Interaktion zu erreichen, wurden die Zellen im 3-D-Pellet kultiviert (Tondreau et al. 2004b; Johnstone et al. 1998; Hegewald et al. 2004b; Fortier et al. 1998). Die Differenzierung erfolgte unter Zugabe von TGF $\beta$ , und wurde unter den Bedingungen, wie sie von (Tondreau et al. 2004b)

geschildert wurden, differenziert. Worster (Worster et al. 2001) beschreibt die Kultivierung der Zellen im Monolayer und deren histologische Auswertung. In dieser Arbeit konnte sowohl eine Kultivierung im Monolayer mit anschließender histologischer Auswertung, als auch eine Kultivierung im 3D-Pellet mit anschließender Auswertung mittels RT-PCR dargestellt werden.

### 4.3. Diskussion der Befunde

#### 4.3.1. Isolierung und Kultivierung der equinen mesenchymalen Stammzelle

Multipotente Stamm- und Vorläuferzellen wurden in den letzten Jahren neben Fettgewebe, Nabelschnurblut und dem Beckenkamm aus dem Sternalpunktat von Pferden isoliert (Fortier et al. 1998). Ihre Aufbereitung wurde nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt, wie es für die Kultivierung von humanen Zellen etabliert wurde (Haynesworth et al. 1992). Es konnte für diese Zellen gezeigt werden, dass sie *in vitro* in einem undifferenzierten Zustand kultiviert und expandiert werden (Haynesworth et al. 1992). Im Gegensatz zu den Daten von Lennon (1996), in denen DMEM und 10% FCS für die Kultivierung verwendet wurde, konnten in dem Standardmedium mit 20% FCS (Klinz et al. 2005; Arnhold et al. 2006b), wie auch in dem Kultivierungsmedium 3 mit 10% DFS, beste Proliferationsergebnisse erzielt werden. Die Zellen können sowohl über einen Ficoll-Gradienten (Hegewald et al. 2004b), aber auch ohne über einen Gradienten zu laufen, isoliert werden (Worster et al. 2000). Andere Voruntersuchungen mit mesenchymalen Stammzellen der Ratte und des Menschen haben gezeigt, daß es sich bei Zellen, die auf der Oberfläche der Kulturschale adhaerent wachsen, um mesenchymale Stammzellen handelt (Ahmed et al. 2006). Dies konnte durch eine Mac-Sortierung, magnetic associated cell – Sortierung, mit spezifischen Stammzellmarkern CD 114, CD 115, CD 34 und CD 133 (Freund et al. 2006) sowie durch immunzytochemische Nachweise mit CD 105 und CD 106 belegt werden.

Diese adhaerenten Zellen proliferieren über lange Zeiträume (Fortier et al. 1998) und können unter Zugabe von Adjuvantien in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenzieren. Ein wichtiges Charakteristikum von eMSC ist ihre Fähigkeit, extensiv in Kultur zu proliferieren, wobei sie typische spindelförmige Morphologie aufweisen (Pittenger et al. 1999). Die Zellen wurden mit 500 Zellen / cm<sup>2</sup> ausgesät. Im Vergleich zu MSC's anderer Spezies ist das eine verhältnismäßig geringe Zahl, die darauf schließen läßt, daß die Zellen in der ihnen gebotenen Umgebung ein sehr großes proliferierendes Potential aufweisen. Dagegen wird in diversen Arbeiten über MSC's anderer Spezies berichtet, daß die Zellen mit einer Zellzahl von 1000-6000 Zellen / cm<sup>2</sup> ausgesät werden (Hegewald et al. 2004b; Klinz et al. 2005; Arnhold et al. 2006b).

Anhand der durchgeführten Qualitätskontrolle, in der das geeignetste Medium mit dem für die Zellen geeignetsten Serum getestet wurde, konnten in der vorliegenden Arbeit zwei Kultivierungsmedien herausgestellt werden. Zum einen ist es das Standardmedium (Kultivierungsmedium 1 mit 20% FCS, Fetal Calf Serum), das bei humanen Zellen etabliert ist (Klinz et al. 2005; Arnhold et al. 2006b), zum anderen das modifizierte Kultivierungsmedium 3, das anstatt FCS Pferdeserum (DHS = Donor Horse Serum) enthält (Lennon et al. 1996). Von den drei getesteten adulten Pferdeseren war nur ein Serum für die Kultivierung der eMSC geeignet. Die verschiedenen Chargen scheinen sich in der Nährstoffzusammensetzung erheblich zu unterscheiden. Das wurde besonders nach Durchführung der Red Oil Färbung, Färbung zur Darstellung von Lipidvakuolen, im Anschluß an die Kultivierung deutlich. Die Zellen, die mit Serum 2 (Donor Horse Serum) kultiviert wurden, bildeten zahlreiche und große Fettvakuolen, die sich von den Vakuolen der Zellen in den Seren 1 und 3 (Donor Horse Serum aus anderen Chargen) deutlich unterscheiden. Deshalb ist davon auszugehen, daß das Serum 2 reichhaltiger an verschiedenen trophischen Faktoren und Supplementen ist. Ähnliche Daten konnten auch nach Kultivierung der Zellen im Fohlenserum erhoben werden, da hier die Zellen einen extrem hohen Gehalt an Fettvakuolen aufweisen. Es zeigte sich außerdem, daß die Auswahl des Mediums bzw. der Serumcharge entscheidenden Einfluß auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der eMSC hat.

#### **4.3.2. Colony forming unit assay**

Zur Bestimmung der Proliferationseigenschaften und -fähigkeiten der eMSC wurden sie in verschiedenen Konzentrationen bzw. mit unterschiedlichen Zellzahlen ausgesäht. Diese Methode wurde bereits in einigen anderen Arbeiten beschrieben (Walker et al. 1974; Lennon et al. 2001; Delorme and Charbord 2007). In diesen Arbeiten wurden MSC von Mensch (Delorme and Charbord 2007), Ratte (Lennon et al. 2001) und Rind (Walker et al. 1974) verwandt. In den dort durchgeführten Untersuchungen konnten ebenfalls Koloniebildungen der MSC verzeichnet werden. Die MSC zeigen, speziesunabhängig, bei einem geringen Zelleinsatz Koloniebildung, die exponentiell mit der eingesetzten Zellzahl steigt.

#### **4.3.3. Beurteilung des Proliferationsverhaltens der Zellen mittels Ki 67**

Ki 67 ist ein Proliferationsmarker, der die Zellen in allen Phasen der mitotischen Zellteilung (S1, G1, G2; M) markiert. Um das Proliferationsverhalten der Zellen darzustellen, wurden die fixierten Zellen mit dem AK-Ki 67 inkubiert. Zellen die sich zu diesem Zeitpunkt, dem Zeitpunkt der Fixierung, in Teilung befanden, werden mit diesem AK markiert.

#### **4.3.4. Kryokonservierung mit anschließender Kultivierung**

Die Kryokonservierung von Stammzellen, seien es mesenchymale, embryonale oder neuronale, wurde in den verschiedensten Publikationen diskutiert (Vescovi et al., 2002; Milosevic et al., 2005; Carvey et al., 2001; (Bruder et al. 1997). Die einheitliche Meinung ist, daß das Kryokonservieren mit späterem Auftauen und erneutem Kultivieren ohne Alterationen der Zellen in ihrem Proliferationsvermögen und Differenzierungsverhalten vonstatten geht. Das ermöglicht, eine große Zahl Zellen einzufrieren und sie nach und nach in die Versuche einzubringen. Ein weiterer Vorteil ist, daß mit vergleichbarem Zellmaterial gearbeitet werden kann und damit die Versuchsergebnisse vergleichbar sind. Die Dauer der Kryokonservierung spielt in diesem Zusammenhang keine Rolle. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden über einen Zeitraum von 1,5 Jahren kryokonserviert, ohne Abweichungen in Morphologie und Proliferationsverhalten zu zeigen. Eine Kryokonservierung über einen solchen Zeitraum wird von 88,68% der Zellen überlebt. Die Möglichkeit der Kryokonservierung der eMSC ist deshalb so interessant, da somit die Zellen eines Pferdes für einen längeren Zeitraum haltbar gemacht werden und später für den therapeutischen Einsatz adhoc wieder zur Verfügung stehen, ohne daß erneut Zellmaterial aus dem Tier entnommen werden muß (Smith et al. 2003b).

#### **4.3.5. Untersuchung zur Vitalität bei verschiedenen Lagerungsbedingungen**

Der Versuch zur Vitalität der Zellen soll zeigen, daß die Zellen selbst bei einer Lagerung auf Eis für einen langen Zeitraum vital bleiben. Dies ist für einen klinischen Einsatz von Bedeutung, dem zum Teil längere Lagerungs- bzw. Transportzeiten vorausgehen könnten. Die Zellen müssen nach Abschluß der Kultivierung vom Labor

bis in die bundesweit gelegenen Praxen und Kliniken zur Implantation transportiert werden. Um eine Implantation vornehmen zu können, die den gewünschten Erfolg bringen soll, sollte mindestens eine Zellzahl von 8 Millionen Zellen vorhanden sein (Smith et al. 2003b). Jedoch muß die Zellzahl auf die Größe des Defekts abgestimmt werden. Vom Ablösen bis zur Implantation der Zellen können bis zu 24 Stunden vergehen. Es muß eine dementsprechend große Zellzahl vor dem Transport eingesetzt werden. Im Versuchsansatz dieser Arbeit kann gezeigt werden, daß nach einem Zeitraum von 26 Stunden nur eine geringe Mortalitätsrate (Eis 19,1% und +4° C 5,8%) zu verzeichnen ist. Selbst nach einer Lagerung von 47 Stunden auf Eis oder bei +4° C können die Zellen wieder adhaerent anwachsen und proliferieren. Aufgrund der Vitalität der Zellen, selbst nach einem langen Lagerungszeitraum, und des unveränderten Wachstumsverhaltens, ist es denkbar, daß die Zellen problemlos auf Eis über Nacht an die behandelnden Tierärzte versendet werden können und im Patienten nach Injektion in das geschädigte Gewebe ihren vollen therapeutischen Effekt erzielen können.

#### **4.3.6. Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Proliferation**

Zellen in einer hypoxischen Atmosphäre zu kultivieren, entspricht dem Milieu, welches in Sehnen-, Band- und Knorpelgewebe herrscht. Da bekannt ist, daß im Knochenmark eine niedrigere Sauerstoffspannung herrscht als in anderen Geweben, sollte der Einfluß des Sauerstoffgehaltes auf das Wachstum und die Morphologie der Zellen untersucht werden. Dazu wurden sowohl kryokonservierte als auch nicht kryokonservierte Zellen von verschiedenen Patienten eingesetzt. Diese Zellen wurden bei verschiedenen Sauerstoffspannungen kultiviert. Zum einen wurden die Zellen bei einem Sauerstoffgehalt von 21% (Standardbedingung) und zum andern bei reduziertem Sauerstoffgehalt von 3% kultiviert. Die Sauerstoffreduktion auf 3% äußerte sich in einem erheblichen Anstieg der Proliferationsrate der Zellen. Ähnliche Ergebnisse konnte (Lennon et al. 2001) in seiner Arbeit mit den Ratten-MSCs verzeichnen. Bei einem Sauerstoffgehalt von 5% konnte er eine höhere Anzahl von Colony Forming Units (CFU) direkt nach der Isolation der Zellen verzeichnen, als es unter Standardbedingungen der Fall war. In den weiteren Passagen konnte in seiner, wie auch in dieser Arbeit ein Anstieg der Proliferationsrate von 30-40% im Gegensatz zu Standardbedingungen verzeichnet werden. Da eine Sauerstoffreduktion von 21%



auf 3-5% einen deutlichen Effekt auf die Proliferationsrate hat, kann geschlossen werden, daß es sich dabei tatsächlich um physiologische Bedingungen handelt. Um diese Zellteilungsaktivität zu visualisieren, wurden die Zellen beider Ansätze dem BrDU Proliferationsassay unterzogen. Da diese sauerstoffreduzierten Kultivierungsbedingungen der Situation *in vivo* vergleichbar sind, wäre es sinnvoll, diese Bedingungen generell für die Expansion von eMSC's anzuwenden.

#### 4.3.7. Zellmigration (wounded healing assay)

Entscheidend für eine gute Gewebsheilung ist, daß die Zellen in dem Defekt, in den sie eingesetzt werden, nicht nur adhaerent werden und proliferieren, sondern auch in das geschädigte Areal migrieren. Sie sollen den Defekt durchwandern und ihn dadurch möglichst vollständig besiedeln. Daß solche MSC migrieren können wurde bereits an humanen epidermalen Keratinozyten, an murinen Corneaepithelzellen sowie an Zellen des peridontalen Ligamentes und an Gingiva Fibroblasten gezeigt (Henemyre-Harris et al. 2008; Gao et al. 2004; Baskin et al. 1997; Lackler et al. 2000). Da dieser Aspekt der Migration bei einem therapeutischen Einsatz ein immens wichtiger Prozeß sein kann, wurde der Migrationsversuch in diese Arbeit aufgenommen. Der Versuchsaufbau entspricht in etwa dem von (Gao et al. 2004). So wurde durch einen konfluenten Zellrasen der eMSC ein Scratch gezogen, der über 18 Stunden vitalmikroskopisch analysiert wird. In dieser Zeit konnte beobachtet werden, daß die Zellen aktiv migrieren, bis die Zusammenhangstrennung wieder vollständig verschlossen ist. Daß es sich hier nicht um ein Nachschieben der Zellen aus der Peripherie der Schale handelt, wird dadurch verdeutlicht, daß einzelne Zellen den Scratch vollkommen eigenständig überqueren. Hierbei wird auch noch einmal sehr stark die Notwendigkeit einer Zell-Zell-Interaktion deutlich. Die Einzelzelle sendet suchende Fortsätze bzw. Pseudopodien aus, mit Hilfe derer versucht wird, schnellstmöglich Zell-Zell-Kontakte wiederherzustellen. Die Zellmigration konnte mit Hilfe der Phalloidininfärbung, zum Nachweis der Aktinfilamente, dargestellt werden. Aufgrund der Erkenntnis, die durch diesen Versuch *in vitro* gewonnen wurden, kann davon ausgegangen werden, daß die eMSC's ein volles migratorisches Potential besitzen.

Die stimulierende Wirkung von IL 6 konnte anhand einer Vitalbeobachtung der Zellen über 48 Stunden eindrucksvoll dargestellt werden. Unter Zugabe von IL 6 konnte

eine erhöhte Zellmotilität erreicht werden, die zu einer beschleunigten Reorganisation des Scratches führte. Dieser positive Effekt auf die Migration wurde bereits in anderen Arbeiten dokumentiert (Wang and Newman 2003).

Um solch eine Wanderung auch *in vivo* nachvollziehen zu können, müßten die Zellen jedoch vor der Implantation in ein Empfängergewebe markiert werden, damit man sie bei darauffolgenden Untersuchungen der Zielstruktur identifizieren kann.

#### 4.3.8. Allgemeine Charakterisierung der equinen mesenchymalen Stammzelle

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Dabei sollten zunächst stammzellcharakteristische Eigenschaften, Proliferationsverhalten und die Expression von Extrazellulärmatrixkomponenten untersucht werden.

CD 90 / THY 1 ist ein Stammzellmarker, dessen positiver Nachweis der Indikator ist, daß es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich um Stammzellen handelt. Ob es eine Reinkultur von Stammzellen ist, kann man anhand einer Auszählung bestimmen, indem man die Zellkerne (blau) und die CD 90 positiv (rot) markierten Zellen gegenüberstellt. Bereits in anderen Arbeiten werden Stammzellen aus dem Knochenmark anhand des Markers CD 90, und anderen, als solche phenotypisch definiert (Delorme and Charbord 2007; in 't Anker et al. 2003). Stammzellen unterschiedlicher Spezies, ob Mensch, Ratte, Maus (Chen-Woan et al. 1996) oder Pferd, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, gleichen sich hinsichtlich ihrer Expression von CD 90.

Zur weiteren Zellcharakterisierung wurden die Zellen mit verschiedenen Antikörpern konfrontiert, mit Hilfe derer die Expression bestimmter Extrazellulärmatrixkomponenten, nachgewiesen werden sollten. Diese Konfrontation soll Aufschluß darüber geben, welche EZM-Moleküle von den Zellen synthetisiert werden. Fibronectin und Perlecan sind Bestandteile der EZM der Zellen. Die Expression von Fibronectin als Bestandteil der EZM konnte bereits in equinen Stroma-Zellen dargestellt werden (Walter et al. 2001). In der immunhistochemischen Auswertung konnte eine ausgeprägte Expression auf diese Marker dargestellt werden. Diese EZM-Proteine sind auch wichtig für die Knorpel- und Knochendifferenzierung.

Darüber hinaus wurde auch die Expression von  $\beta 1$  Integrin, auch bekannt als CD 29, untersucht. Hierbei handelt es sich um ein 130 kDa transmembranäres Glycoprotein das nichtkovalente Bindungen/Komplexe mit verschiedenen Integrin alpha Untereinheiten eingeht, um einen funktionellen Rezeptor zu bilden, der spezifisch an Extrazellulärmatrixproteinen bindet (Poole and Muller 2005; Friedlander et al. 1996; Hieken et al. 1996).

Integrine sind Membran-Rezeptoren, die für eine Zell-Zell- oder eine Zell-Matrix-Bindung stehen. Alle Integrine sind transmembranäre heterodimere, die aus alpha und beta Untereinheiten bestehen und zum Zytoskelett gehören.

$\beta 1$ Integrine sind involviert in Zellwachstum, verschiedene epidermale Differenzierungen, Migration und Apoptose. Die Expression von  $\beta 1$  Integrin-Untereinheiten wird durch Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta 1$  reguliert (Ivaska et al. 2002; Huan and van Adelsberg 1999; Yeh et al. 1998; Cervella et al. 1993). Der positive Nachweis von  $\beta 1$  Integrin, der in dieser Arbeit erbracht werden konnte, gibt Aufschluß darüber, daß die Zellen mit ihrer EZM über das transmembranäre Protein gekoppelt sind.

#### 4.3.9. Untersuchung der Pluripotenz

Die Pluripotenz der eMSC's wurde anhand ihres adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungspotentials ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden, daß sie ebenso eine Pluripotenz wie das bereits bei MSC's von humanen (Cui et al. 2006; Noth et al. 2002; Hong et al. 2005), porcinen (Moscoso et al. 2005), bovinen (Colleoni et al. 2005; Bosnakovski et al. 2005; Bosnakovski et al. 2006) sowie von Zellen der Ratte (Xu et al. 2006; Farrell et al. 2006) gezeigt werden konnte. Die genutzten Isolierungs-, Kultivierungs- und Differenzierungstechniken bestehen aus einer Kombination verschiedener bereits angewandter und modifizierter Techniken (Ringe et al. 2002; Martin et al. 2002; Bosnakovski et al. 2005). Die bereits in der Arbeitsgruppe erfolgreich angewandten Methoden, der gerichteten Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in die verschiedenen Differenzierungsrichtungen in Fett-, Knorpel- und Knochenzellen konnten ebenfalls erfolgreich auf die Pferdezellen übertragen werden. So konnten bereits nach einer Differenzierungszeit von zwei Wochen erste morphologische Veränderungen in

Richtung einer osteogenen und adipogenen Differenzierung beobachtet werden, die nach drei Wochen noch viel deutlicher ausfielen.

Bei der adipogenen Differenzierung wurden traubenförmige Anhäufungen von Vakuolen sichtbar, die typisch für eine solche Differenzierungsrichtung sind (Tondreau et al. 2004a; Schutze et al. 2005; Pittenger et al. 1999; Mauney et al. 2005).

Ein morphologisches Merkmal der osteogenen Differenzierung, das bereits bei anderen Spezies beobachtet werden konnte, ist, daß sie ihre fibroblastenähnliche Morphologie verlieren und ein eher kubisches Aussehen erlangen. Desweiteren bilden sie Cluster aus Knochenbälkchen ähnelnden Strukturen aus, die mit Hilfe der Van-Kossa-Färbung schwarz angefärbt werden. Diese Eigenschaften der osteogen differenzierten Zellen konnten bei MSC's der Ratten, von Rindern und des Menschen (Mizuno et al. 2000); (Bruder et al. 1997); (Bosnakovski et al. 2005), aber nicht bei den MSC's von Katzen und Schafen beobachtet werden (Martin et al. 2002; Kon et al. 2000). Die Kultivierung osteogen differenzierender Zellen wurde desweiteren in einer Rotationskultur durchgeführt. Die MSC befanden sich in diesem Versuchsaufbau auf Microcarriern, einem Trägermaterial. Die Rotationskultur sollte einen Zustand der Schwerelosigkeit imitieren und eine bessere Versorgung der Zellen garantieren, was zu einer stabilen 3D-Konstruktion von Knochenbälkchen führen sollte. Der positive Effekt eines solchen rotierenden Zellkultursystems wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Saxena et al. 2007; Meyers et al. 2005; Marquette et al. 2007).

Der Nachweis einer chondrogenen Differenzierung konnte mit Hilfe zweier Methoden nachgewiesen werden. Zum einen wird eine Differenzierung in dieser Arbeit sowohl histologisch (Worster et al. 2001) als auch mittels der RT-PCR (Bosnakovski et al. 2005) gezeigt, wie dies bereits bei anderen Spezies demonstriert werden konnte. Zwingende Voraussetzungen für die chondrogene Differenzierung ist, daß die Zellen in einer 3D-Pelletkultur, d.h. in einem Röhrchen, kultiviert werden. In der histologischen Auswertung der Paraffinschnitte werden die blaugefärbten, sauren Mukopolysaccharide der chondrogen differenzierten Zellen deutlich. Ebenso ist der positive Nachweis einer Kollagen II Expression in der PCR ein deutlicher Nachweis der chondrogenen Differenzierung (Bosnakovski et al. 2005). Aggrecan wurde ebenfalls als spezifischer Primer zum Nachweis von Proteoglycanen in der RT-PCR eingesetzt (Schmal et al. 2006, Motomura et al. 2006, Fortier et al. 2007); somit

konnte der Beweis einer chondrogenen Differenzierung eindeutig dargestellt werden. Da  $\beta$ -Actin in allen Zellen exprimiert wird, wurde  $\beta$ -Actin als „housekeeping Gen“ eingesetzt und dient der Überprüfung der eingesetzten Proben. Ebenfalls sollte mit Aggrecan immunhistochemisch nachgewiesen werden, ob undifferenzierte Zellen bereits Knorpelmerkmale aufweisen. Es zeigt sich allerdings, daß die nicht vordifferenzierten eMSC's eine nur eine geringe Expressionsrate aufwiesen. Nach Differenzierung weisen diese eMSC's eine deutliche Expressionsrate auf. Der Nachweis der Pluripotenz der eMSC's ist von entscheidender Bedeutung bei der späteren therapeutischen Implantation der Zellen in das Empfängergewebe. Die Zellen müssen pluripotent sein, um entweder in den verschiedenen Empfängergeweben (z.B. Knochen, Sehne, Knorpel und Muskulatur) aufgrund der dort vorherrschenden Verhältnisse in den entsprechenden Zelltyp zur Geweberegeneration differenzieren zu können, oder vordifferenziert sein. Insbesondere bei einem regenerativ-therapeutischen Einsatz im Fesseltrageapparat ist die Voraussetzung zur Differenzierung von besonderer Bedeutung, da es sich hier um ein Mischgewebe aus Sehne, Muskulatur und Bandmaterial (LTT) handelt. Somit bildet die Fähigkeit der Zellen zur Pluripotenz die Grundlage für eine therapeutische Verwendung.

#### 4.3.10. Transduktion der eMSC mit einem adenoviralen Vektor

Die Möglichkeit, Zellen mit einem adenoviralen Vektor unter Verwendung des GFP Konstruktes zu markieren, stellt erhebliche Vorteile in der Detektion der Zellen in einem Empfängergewebe dar (Duan et al. 2006; Piersanti et al. 2006; Lang et al. 2006; Xia et al. 2005). Zu einem Nachweis der Zellen *in vivo* könnten die zur Transplantation vorgesehenen Zellen *in vitro* mittels radioaktiver Methoden markiert werden, so daß sie, *in vivo*, szintigraphisch mit Hilfe einer  $\gamma$ -Kamera erfaßt werden können. Ist die Identifizierung der Zellen jedoch histologisch angestrebt, kann eine GFP-Markierung der Zellen sinnvoll sein. Für diese Markierungen und im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der Zellen im Rahmen der Gentherapie (Colleoni et al. 2005) wurde auf der Basis eines adenoviralen Vektors der 3. Generation, der die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP) trägt, ermittelt, welche Konzentration von Viruspartikeln pro Zelle benötigt werden, um eine möglichst große Anzahl markierter Zellen in der Gesamtzellpopulation zu erhalten. Dazu wurden

Vektorkonzentrationen von 10, 50, 100 und 200 MOI gewählt, die für einen Zeitraum von 48 Stunden auf die Zellpopulation appliziert wurden, um die Transduktion der Zelle zu ermöglichen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und mit Hoechst dye, einer Kerngegenfärbung gefärbt, so daß die Transduktionsrate ermittelt werden konnte.

Wie bereits bei porcinen MSC's (Bosch et al. 2006) und auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann auch in den Pferdezellen eine vektorinduzierte GFP-Expression erzielt werden. Um nahezu 100% der Zellen markieren zu können, wird allerdings eine hohe Vektorkonzentration benötigt. Wie in der Graphik sichtbar wird, wächst die Anzahl der markierten Zellen allerdings nicht proportional, d.h. konzentrationsabhängig, wie man es nach der Zugabe des Vektors erwarten würde. Damit ist ein gentherapeutischer Einsatz eher fragwürdig, oder es müßte für die Markierung eine nicht-virale Transfektion durchgeführt werden, aber bei einer solchen wären die Transduktionsraten noch niedriger.

#### **4.3.11. Einsatz verschiedener Trägermaterialien**

Nach erfolgreicher Isolierung und Kultivierung der eMSC's sollten im nächsten Schritt nunmehr Trägermaterialien für den therapeutischen Einsatz geprüft werden. Es wurden dazu drei Trägermaterialien ausgewählt. Sie sollen für den Einsatz in der Praxis möglichst leicht zu handhaben, sowie in einem kurzen Zeitraum herstellbar sein und sich insbesondere für einen Einsatz beim Pferd eignen. Aufgrund des hohen Eigengewichtes der Tiere sind sowohl die betroffenen Strukturen als auch die Trägermaterialien, die zur Stabilisierung der Defekte, z.B. für Knochen-, Knorpel- und Sehnenläsionen oder Läsionen eines Mischgewebes, eingesetzt werden sollen, hohen Belastungen ausgesetzt. Sowohl am Menschen, bei der Ratte als auch an Kaninchen konnten bereits verschiedene kollagene Trägermaterialien in Verbindung mit MSC's erfolgreich an Sehnendefekten, z.B. an der Patellarsehne des Kaninchens oder nach Extraktion molarer Zähne des Menschen, sowie bei Reparation des weichen Gaumens bei Pferden, getestet werden (Farrell et al. 2006; McGuire and Scheyer 2006; Lubiowski et al. 2005; Carstanjen et al. 2006).

Bei dem ersten Trägermaterial, das auf seine Einsatzmöglichkeit getestet wurde, handelt es sich um ein einfaches Kollagen I Gel. Dies scheint als Trägermaterial sehr vorteilhaft zu sein. Das Gel wird von den Zellen als Träger akzeptiert, denn sie



zeigen ein gutes morphologisches Aussehen und können über einen Zeitraum von drei Wochen in diesem Gel kultiviert werden. Die Zellen überleben diesen Kultivierungszeitraum nicht nur, sondern beginnen außerdem, kurz nach dem Einbringen in dieses Gel, Fortsätze auszubilden und sich zu vernetzen. Eine gute Proliferationsrate mit Zunahme der Netzdichte ist ebenfalls zu verzeichnen. Es entsteht somit ein dichtes Maschenwerk von eMSC, die somit ein stabiles Transplantat bilden können. Trotz der ausgeprägten Netzwerkbildung handelt es sich bei dem Kollagengel um ein sehr flexibles Material. Ein weiterer großer Vorteil dieses Gels ist, daß es problemlos auf die Defektgröße zugeschnitten werden kann. Eine bedeutende Einsatzmöglichkeit für ein solches Gel wären Knorpeldefekte, die entweder mit eMSC oder autolog gewonnenen Chondrozyten gefüllt werden könnten, da die Zellen auch in diesem Gel verbleiben und vor Ort differenzieren können. Die Zellen können somit nicht aus dem Defekt abschwimmen. Die Befestigung eines solchen Gels kann z.B. mittels Fibrinkleber geschehen. Dieser wird beispielsweise auch bei einer autologen Chondrozyten Transplantation (ACT), Knorpelzellen, die aus einem anderen Bereich des Tieres entnommen und aufbereitet wurden, im Knorpeldefekt angewandt (Litzke et al. 2004). Bei der ACT werden die Zellen derzeit allerdings ohne ein Trägermaterial eingesetzt.

Allerdings besteht auch die Möglichkeit, die Zellen direkt auf einer Fibrinmatrix bzw. auf Fibrinbeads zu kultivieren (Mok et al. 1994).

Diese Beads bestehen aus einem Netzwerk aus Fibrin, die aus dem Fibrinkleber Tissucol der Firma Baxter hergestellt werden. In diesem Netzwerk können die eMSC in den Nischen und auf der Außenseite adhaerent wachsen. Die Zellen können auch auf diesem Material über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, ohne daß morphologische Degenerationserscheinungen auftraten. Die Semidünnschnittaufnahmen bieten dem Betrachter einen Überblick über die Zellmorphologie auf diesem Trägermaterial. Die Zellen, die der Außenseite der Fibrinmatrix anliegen, zeigen eine schöne, lang gestreckte Form, wie sie auch unter normalen Kulturbedingungen auftritt. Sie liegen in mehreren Schichten übereinander. Innerhalb der Fibrinmatrix läßt sich erkennen, daß die Zellen einen bestimmten Raum bzw. Maschengröße benötigen, um sich gut ausbreiten zu können. Ist die Matrix zu engmaschig, findet man nur vereinzelte Zellen im Innern des Materials, die dann nicht mehr optimal mit Wachstumsfaktoren versorgt werden. Es können dann vorrangig Zellen auf der Außenseite detektiert werden. Allerdings ist in

Semidünnschnitten deutlich zu erkennen, daß vereinzelt auch morphologisch intakte Zellen in einem Hohlraum zu finden sind. Elektronenmikroskopisch lassen sich Interaktionen zwischen den Zellen und der Trägermatrix darstellen. Nach längeren Kultivierungszeiten kann sogar die Synthese von EZM detektiert werden, durch Nachweise von Kollagenfibrillen. Es kommt sozusagen zu einer innigen Verzahnung der Zellen mit dem Trägermaterial.

Das Trägermaterial bietet sich für eine therapeutische Anwendung an, da auch diese Form des Trägers gut in das Empfängergerewebe integriert werden kann (Goessl 2006). Das Schicksal der Zellen, insbesondere ihres Integrationspotentials im Empfängergerewebe muß allerdings noch histologisch evaluiert werden. Dabei könnten wieder Zellen, die zuvor mit einem Vektor transduziert wurden, zum Einsatz kommen. Die Zellwanderung könnte anhand dieser Markierung gut beobachtet und ausgewertet werden. Die Anwendungsmöglichkeiten liegen sowohl in der Therapie von Knochen-, Knorpel- wie Sehnendefekten.

Ein hervorragendes Trägermaterial scheinen sogenannte Microcarrier darzustellen. Bei ihnen handelt es sich um dreidimensionale poröse Gebilde, die aus einer spezifisch verdrillten Kollagenmatrix bestehen. Diese poröse Matrix bietet den Zellen sowohl im Inneren des Microcarriers als auch auf der Außenseite optimale Haftungsbedingungen. Sie besitzen jedoch im Gegensatz zu den Fibrinbeads wesentlich kleinere Durchmesser (150–200 µm). Aufgrund dessen eignen sich die MC besonders für eine nicht-statische Kulturform in der Rotationskultur. Auf diesen MC können sie dann auch in kleinere Läsionsbereiche eingesetzt werden. Der erfolgreiche Einsatz von Microcarriern, in Verbindung mit Zellen, für einen therapeutischen Einsatz im Gehirn konnte bereits bei der Parkinsontherapie (Campbell et al. 1993) mit retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) gezeigt werden. Die Zellen vernetzen die einzelnen Microcarrier miteinander, so daß ein stabiles Netzwerk aus Microcarriern und Zellen entsteht.

Der Vorteil all dieser Trägermaterialien ist, daß die Zellen auf einer festen Matrix, die ihnen bekannt ist und an die sie adaptiert sind, in eine fremde Umgebung gelangen. Werden die Zellen ohne Matrix eingebracht, sind sie von den dort in der Regel vorherrschenden degenerativen Prozessen, durch die Ausschüttung von Zytokinen etc, viel angreifbarer. Sie können nicht sofort auf ihre Umgebung reagieren, sondern benötigen eine längeren Zeitraum zur Adaptation. Ein weiterer Nachteil ist, daß einzelne Zellen sehr leicht aus einem Gewebe, in das sie injiziert wurden,

abgeschwemmt werden können. Sitzen sie einer Matrix auf, bzw. sind sie in eine Matrix integriert, bilden die Zellen mit der Matrix eine große Oberfläche und können deshalb zwangsläufig nicht so schnell aus dem Implantationsgewebe wegdiffundieren und können somit größere Defekte abdecken.

#### **4.3.12. Klinisch- therapeutischer Einsatz der eMSC**

Mesenchymale Stammzellen sollen für die verschiedensten klinischen Bilder einsetzbar sein. Das Hauptaugenmerk liegt neben einem Einsatz in der Knochenchirurgie (Osteoneogenese) auf einem Einsatz bei Knorpelerkrankungen, sowie auf der Therapie der Tendopathien unterschiedlichster Genese. So sollen Sehnenerkrankungen von oberflächlicher und tiefer Beugesehne, sowie Verletzungen des Fesseltrageapparates unter Verwendung der eMSC therapiert werden können. Dazu werden die eMSC in die betroffenen Strukturen, in denen der Defekt vorliegt, transplantiert bzw. injiziert. Eine Reimplantation der Zellen wird bereits seit einiger Zeit von (Smith et al. 2003b) praktiziert. Die Zellen werden nach Selektionierung und Expansion ohne Trägermaterial in Läsionen von Pferden injiziert. Aus der Arbeit von (Smith et al. 2003b) geht hervor, daß die Zellen vor der Reinjektion in Plasma mit Heparin resuspendiert werden. Dieses Plasma-Zellgemisch wird dann in die betroffene Struktur injiziert. In unseren klinischen Untersuchungen verwenden wir in Zusammenarbeit mit den klinischen Kooperationspartnern zur Resuspension des Zellpellets entweder NaCl-Lösung oder autologes Knochenmark. Die Nutzung von autologem Knochenmark verspricht eine vermutlich noch bessere Gewebeverträglichkeit als Plasma oder NaCl-Lösung, aufgrund der darin enthaltenen trophischen Faktoren. Welche Faktoren hier eine Rolle spielen, ist allerdings noch nicht genauer untersucht.

Der Zellinjektion schließt sich ein Trainingsplan an, der vom Pferdebesitzer genau eingehalten werden sollte, damit die verletzte Struktur optimal heilen kann. Der genaue Trainingsplan wird vom behandelnden Tierarzt ausgearbeitet, da dieser die Situation des Pferdes und den Verletzungsgrad am besten beurteilen und einschätzen kann.

Nach einer solchen Zellinjektion kann es in vereinzelten Fällen zu leichten Entzündungsreaktionen der betroffenen Strukturen kommen. Diese stellen sich in der typischen Umfangsvermehrung im Sehnenbereich (Bogen) dar. Zuzüglich kommt es

zur vermehrten Schmerzhaftigkeit, die sich in reiner Druckschmerzhaftigkeit bis hin zur Lahmheit äußern kann, sowie zu einer Temperaturerhöhung in dem betroffenen Gebiet. Möglicherweise handelt es sich bei diesem klinischen Bild um eine Reaktion auf geringe Serumreste, die bei der Injektion der eMSC vorhanden waren. Ultrasonographisch läßt sich eine Vergrößerung des Defektes beobachten. Trotz dieser auftretenden Entzündungsreaktion durchbauen sich diese Sehnen im gleichen Zeitraum wie die behandelten Stellen, die anfänglich keine Entzündungsreaktionen zeigten.

Drei Monate nach Zellinjektion sind die Schädigungen innerhalb des Sehnengewebes kaum noch zu erkennen. Das Gewebe ist gut durchbaut und stellt sich ultrasonographisch durch eine sehr homogene helle Struktur dar. Die Schwellungen, sowie vermehrte Wärme und Schmerzhaftigkeit sind abgeklungen. Die Tiere zeigen in der Regel keine weiteren Lahmheiten. Bei der untersuchten Gruppe von 30 Pferden sind im Zeitraum von 9 Monaten bislang keine Rezidive zu verzeichnen. Einige Pferde stehen jedoch zu diesem Zeitpunkt noch zur Nachuntersuchung an. Die Ergebnisse werden mit großem Interesse erwartet.

Die Anwendung dieses neuen Verfahrens wird sehr kontrovers diskutiert. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stellen sich die Ergebnisse dieser Behandlung beim Pferd positiv dar (Smith et al. 2003b).

Im Bezug auf eine Sehnenbehandlung konnten ebenso beim Kaninchen positive Resultate (Awad et al. 1999b) verzeichnet werden. Dem gegenüber stehen die bekannten Therapieverfahren zu Behandlung von Tendinitiden (Rapp et al. 1992). Zu diesen Therapieansätzen gehören die konservative Behandlung (Ruhe, Behandlung mit Eis und heparinhaltigen Salben, zuzüglich anti-inflammatorischer Maßnahmen (Morelli and James 2004), das Sehnensplitting (Reiners et al. 2002), die Nutzung der Stoßwellentherapie (Kersh et al. 2006; Wang et al. 2005; Diakakis et al. 2005; Rompe 2006) und die Implantation von Kohlenstoffasern (McCullagh et al. 1979; Littlewood 1979). Mit all diesen Therapieansätze konnten Heilungserfolge erzielt werden. Teilweise sind jedoch die genauen Mechanismen, die die Heilung positiv beeinflussen noch unklar. Das trifft z.B. vor allem auf die Stoßwellentherapie und das Sehnensplitting unter Verwendung von autologem Knochenmark zu. Bekannt ist, daß bei diesen Methoden eine Neovaskularisation eingeleitet wird.

Aufgrund dieser kontroversen Diskussion sollen weitere Untersuchungen, wie die szintigraphische Untersuchung *in vivo*, zum Verbleib der mit Radionukliden

markierten eMSC's, sowie eine histologische Untersuchung, möglicherweise an einer Biopsie des behandelten Gewebes, durchgeführt werden, damit eine Therapie mit MSC's wissenschaftlich evaluiert und sicher angewendet werden kann.

Leider fehlt zu einer objektiven Beurteilung der Wirksamkeit der eMSC bei einem therapeutischen Einsatz eine Kontrollgruppe, die eine Gruppe unbehandelter Pferde umfassen müsste, sowie eine Gruppe von Pferden, die mit einer anderen Behandlung, z.B mit einer intradeninösen Injektion mit Hyaluronsäure behandelt würde. Die klinischen Daten sind somit zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgearbeitet und dokumentiert.

#### 4.4. Ausblick

Wie bereits erwähnt und in der Literatur beschrieben, werden die MSC derzeit hauptsächlich zur Regeneration von defektem Sehnengewebe eingesetzt. Diese Zellen sind bislang undifferenziert. Einen größeren Benefit würde man natürlich mit bereits vordifferenzierten Zellen erwarten. Deshalb ist der nächste Schritt, die Differenzierung der adulten equinen MSC in Tenozyten. Hierfür gibt es bereits Protokolle, die diese Differenzierungsrichtung am Kaninchen belegen (Awad et al. 1999a; Awad et al. 2000b). Ein weiterer wichtiger Schritt in diese Richtung ist das Austesten der Wirkung von nicht steroidal Antiphlogistika (NSAID) auf eMSC. Sollten die Antiphlogistika Auswirkungen auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen haben, muß ein paralleler Arzneimiteleinsatz bei der Stammzelltherapie kritisch hinterfragt werden.

Desweiteren ist eine klinische Studie in Planung, bei der weitere Trägermaterialien *in vitro* und *vivo* getestet werden sollen. Es muß Aufschluß darüber erbracht werden, welches Trägermaterial für welche Anwendung in Frage kommt und wie diese einfach und kostengünstig, vor allem verträglich für den Patienten, anzuwenden sind.

Sowohl die Zellen, die ohne Träger, als auch die Zellen die später einmal mit Träger implantiert werden sollen, sollen auch nach der Implantation verfolgt werden können. Deren Verbleib *in vivo* soll zum einen radiologisch dargestellt werden können, durch Markierung der Zellen mit Radionukliden, z.B Indium 111. Desweiteren soll der Zellverbleib auch histologisch dargestellt werden können. Dazu dient die bereits getestete Vektormarkierung mit der Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), mit Hilfe dessen die Zellen in histologischen Schnitte detektiert werden können.

Im Hinblick auf einen routinemäßigen Einsatz von MSC in der Pferdemedizin ist es dringend erforderlich eine kontrollierte Studie mit Kontrollgruppe, einem klinischen Score und definiertem Rehabilitationsplan durchzuführen, so daß über die tatsächliche positive Wirkung der eMSC und eine funktionelle Integration Aussagen gemacht werden können.



## 5. Zusammenfassung

Osteoarthritis und Sehnenverletzungen sind häufige Gründe für eine erhöhte Morbidität und verminderte Leistungsfähigkeit bei Pferden oder Kleintieren.

Aufgrund des langen Zeitraums, die das Gewebe für die Eigenregeneration benötigt, ist eine Auswahl an Therapiemöglichkeiten mit niedrigerer Regenerationszeit und somit mit schnellerer Belastbarkeit der Strukturen unabdingbar.

Zu den mittlerweile gebräuchlichen Therapieansätzen, die sich von der konservativen Therapie bis hin zu Ersatzmaterialien belaufen, wäre es eine interessante und vorteilhafte Alternative, körpereigene Zellen aufzuarbeiten und diese in Form eines Transplantates in den Defekt einzubringen. Zu den möglichen körpereigenen Zellen gehören mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark.

Das Ziel dieser Studie war, die aus dem Pferd gewonnenen und isolierten equinen Mesenchymalen Stammzellen (eMSC) näher zu charakterisieren. Um die Potenz der MSC's für einen therapeutischen Einsatz zu untersuchen, wurden morphologische Untersuchungen mit diesen isolierten Stammzellen *ex vivo* durchgeführt und anschließend beurteilt.

Nach Trennung der Knochenmarkflüssigkeit in ihre Bestandteile, Zellen, Blut und Restbestandteile, konnten die Zellen in einer Zellkultur aufgereinigt und expandiert werden. Im Zuge der Expansion wurden verschiedene Seren und Medien, zu Anreicherung, im Hinblick auf Proliferation getestet. Zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens wurde ein Colony Forming Unit Assay (CFU-Assay) durchgeführt. Anhand diesem sollte gezeigt werden, wie sich das Koloniewachstum in Abhängigkeit der Zellzahl entwickelt.

Um das Proliferationspotential, sowohl im Moment der Zellteilung, als auch in einem Zeitraum von 24 Stunden darzustellen, wurden die Zellen mit Ki 67 zum Zeitpunkt der Fixierung und mit BrDU über 24 Stunden konfrontiert.

Nach erfolgreicher Isolation und Expansion, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Diesen Vorgang überstanden die Zellen ohne Alterationen aufzuweisen. Selbst nach einer Kryokonservierung von 1,5 Jahren stellten sich die Zellen unverändert dar.

Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden die eMSC bei unterschiedlichen Bedingungen, zum einen auf Eis und zum anderen bei 4° C, gelagert. Bei diesem Versuchsaufbau sollte geklärt werden, ob es eine Möglichkeit ist, die Zellen gekühlt

zur Tierarztpraxis/-klinik zu senden. Dabei stellte sich heraus, daß eine Lagerung der Zellen unter beiden Bedingungen für zwei Tage mit nur geringem Zellverlust möglich ist.

Da bekannt ist, daß im Knochenmark eine niedrige Sauerstoffspannung herrscht, wurden die Kulturbedingungen dahingehend variiert, daß der Sauerstoffgehalt von 21% auf 3% in einer Hypoxiekammer herabgesetzt wurde. Die dadurch gesteigerte Proliferationsfähigkeit der eMSC konnte sowohl mit Ki 67 als auch mit BrDU visualisiert werden.

Auf den Stammzellmarker THY 1 / CD 90, der in anderen morphologischen Studien routinemäßig eingesetzt wird, reagierten die Zellen positiv. Ein weiterer Stammzellmarker, Oct 4, konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden.

Im Rahmen einer immunhistochemischen Charakterisierung konnte der Nachweis erbracht werden, daß die Zellen in ihrer Extrazellulärmatrix (EZM) Fibronektin, Perlecan, Aggrecan und Kollagen IV exprimieren. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix über das transmembranäre Protein  $\beta 1$  Integrin erfolgt.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Pluripotenz der eMSC zeigten die Differenzierbarkeit der Zellen in die verschiedenen Richtungen wie Fett, Knorpel und Knochen, sowohl vor wie nach der Kryokonservierung.

Untersuchungen zum Migrationsverhalten zeigten, daß eine deutliche Zellmotilität vorhanden war. Dies wurde mit Hilfe einer Phalloidin-Färbung visualisiert. Die Migration der Zellen konnte durch Zugabe von Interleukin 6 positiv beeinflusst werden.

Die Transduktion der Zellen, mit einem adenoviralen Vektor, mit der Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP), zur Markierung der Zellen, konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Diese Markierung soll bei einer späteren Detektion der Zellen im Zielgewebe helfen.

Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz im tissue engineering ist die Kultivierung auf verschiedenen Trägermaterialien untersucht worden. Auf allen getesteten Trägermaterialien (Kollagen-Gel, Microcarrier und Fibrinkügelchen) war eine Kultivierung für mindestens drei Wochen möglich, ohne daß die Vitalität der

Zelle abnimmt. Desweiteren wurden die Zellen in einer Rotationskultur auf Microcarriern kultiviert, einer Versuchsanordnung, die die Schwerelosigkeit imitiert und eine gleichmäßige Versorgung der Zellen garantiert.

Der therapeutischer Einsatz von entnommenen, isolierten und expandierten Zellen wurde bereits erfolgreich durchgeführt. Mit Hilfe der Zellinjektion konnte ultrasonographisch eine verbesserte Durchbauung eines Sehnendefektes nachgewiesen werden. Die Pferde, bei denen eine solche Zellinjektion stattgefunden hatte, zeigten eine deutliche Besserung, bis hin zum Verschwinden, der klinischen Symptome. Der klinische Einsatz von mit Zellen beschickten Trägermaterialien soll noch in weiterführenden Studien getestet werden.

## 6. Summary

Osteoarthritis and tendon injuries are often the reason for a high morbidity rate and a reduced ability in horses and small animals.

Due to the long regeneration phase that is required by the tissue for self-renewal, a range of critical options with a shorter regeneration phase enabling a swifter recovery is indispensable.

In addition to conventional therapy practice ranging from the more classical methods as well as the use of substitute materials, an interesting alternative would be to process autologous cells with the aim to transplant them into the injured tissues. For this purpose mesenchymal stem cells (MSC) isolated from the bone marrow stroma would be an autologous cell source.

The purpose of this paper is to further characterize mesenchymal stem cells (eMSC) from horses.

In order to examine the potency of MSCs for therapeutic purposes, morphologic examinations with isolated stem cells *ex vivo* were carried out and evaluated.

The cells were isolated from the bone marrow fluid with the aim of cultivation and expansion in the cell culture laboratory.

During the expansion period different serum batches and methods for accumulation were tested with regards to their impact on proliferation.

To evaluate the characteristics of proliferation a colony forming unit assay (CFU assay) was performed.

To show the characteristics of proliferation in both, the moment of cell division and the period of 24 hours, proliferation marker Ki 67 was applied at the time of fixation as was Bromodeoxyuridine (BrDU) over the period of 24 hours.

After a successful isolation und expansion, the cells were cryoconserved in liquid nitrogen. The cells survived the treatment without alteration. Even after cryoconservation for up to 1.5 years, the cells remained unaltered.

To examine the vitality of the cells the eMSC were stored under different conditions both, on ice and at 4° C. This experimental setup was to approve the possibility to

transport refrigerated cells to the veterinarians' practice / clinic . Both methods approved that storage for two days is possible with only a limited loss of cells.

Since the oxygen content in the bone marrow is lower than in the surrounding tissue, the cell culture conditions were adjusted by reducing the oxygen concentration accordingly from 21% to only 3%. The effect was achieved by reducing the oxygen content in a hypoxia chamber.

The visualization of the proliferation potential was achieved using the BrDU assay or immunocytochemically with the Ki 67 proliferation marker.

The eMSCs were immunopositive for the stem cell marker CD 90 furthermore the stem cell marker Oct-4 could be detected using RT-PCR.

Stem cell characteristics were investigated immunocytochemically by detecting the expression of Fibronectin, Perlecan, Aggrecan and Collagen IV as a part of its extracellular matrix (ECM).

Further on, it could be shown that the interaction of cells with its ECM is regulated via the transmembrane protein  $\beta$ 1-Integrin.

Test results about the pluripotency of cells showed the differentiation between fat, cartilage and bone was successful before and even after cryoconservation.

Studies on the migratory behavior proved that cells can be stimulated to perform a cell motility. The visualization of the migration was achieved using the phalloidin staining. Furthermore, the migration of the cells was positively influenced by the addition of Interleukin 6.

The transduction of the cells with an adenoviral vector, with the GFP sequence to mark the cells, was also carried out successfully. The transduction was carried out in order to support the future detection of cells in the tissue of the recipient.

Cultivation on different carrier materials was intended with regard to a therapeutic application in tissue engineering. Cultivation of cells on all carrier materials tested (collagen gel, collagen micro carriers and the fibrin sealant Tissucol) was possible and the viability of cells could be demonstrated for up to 3 weeks. Furthermore, the cells were cultivated in a rotary cell culture system on microcarriers, a test

arrangement which imitates microgravity and ensures an optimal supply of trophic substances.

The therapeutic application of extracted, isolated and expanded cells had been carried out successfully.

The application of this treatment made a recovery of the tendon damage possible and outlined ultrasonographically.

The tests on horses that had received an injection of cells over nine month observation period showed a definite improvement and in some cases even a disappearance of the clinical symptoms.

The clinical application of carrier materials has yet to be tested.



## 7. Referenz-Liste

Ahmed N, Vogel B, Rohde E, Strunk D, Grifka J, Schulz MB, Grassel S (2006) CD45-positive cells of haematopoietic origin enhance chondrogenic marker gene expression in rat marrow stromal cells. *Int J Mol Med* 18:233-240

Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, Absenger Y, Basnaoglu S, Kreppel F, Henke-Fahle S, Kochanek S, Bartz-Schmidt KU, Addicks K, Schraermeyer U (2006a) Adenovirally Transduced Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Pigment Epithelial Cells and Induce Rescue Effects in RCS Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4121-4129

Arnhold S, Klein H, Klinz FJ, Absenger Y, Schmidt A, Schinkothe T, Brixius K, Kozlowski J, Desai B, Bloch W, Addicks K (2006b) Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system. *Eur J Cell Biol* 85:551-565

ASHEIM A (1964) SURGICAL TREATMENT OF TENDON INJURIES IN THE HORSE. *J Am Vet Med Assoc* 145:447-51.:447-451

Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI (1999b) Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5:267-277

Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI (1999a) Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 5:267-277

Awad HA, Butler DL, Harris MT, Ibrahim RE, Wu Y, Young RG, Kadiyala S, Boivin GP (2000a) In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *J Biomed Mater Res* 51:233-240

Awad HA, Butler DL, Harris MT, Ibrahim RE, Wu Y, Young RG, Kadiyala S, Boivin GP (2000b) In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *J Biomed Mater Res* 51:233-240

Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ (1998) Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3908-3913

Baird RW, Walters EL, Stacey PJ (1993) Status of the bottle-nosed-dolphin, *tursiops truncatus*, with special reference to Canada. *Canadian Field-Naturalist* 107:466-480

Barnewitz D, Evers A, Zimmermann J, Wilke I, Kaps C, Sittlinger M (2003) [Tissue engineering: new treatment of cartilage alterations in degenerative joint diseases in horses--preliminary results of a long term study]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 116:157-161

Baskin LS, Sutherland RS, Thomson AA, Nguyen HT, Morgan DM, Hayward SW, Hom YK, DiSandro M, Cunha GR (1997) Growth factors in bladder wound healing. *J Urol* 157:2388-2395

Benya PD, Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30:215-224

Birch HL, Bailey AJ, Goodship AE (1998) Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition. *Equine Vet J* 30:534-539

- Boniface RJ, Cain PR, Evans CH (1988) Articular responses to purified cartilage proteoglycans. *Arthritis Rheum* 31:258-266
- Bosch G, Lin YL, van Schie HT, van De Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR (2007) Effect of extracorporeal shock wave therapy on the biochemical composition and metabolic activity of tenocytes in normal tendinous structures in ponies. *Equine Vet J* 39:226-231
- Bosch P, Pratt SL, Stice SL (2006) Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 74:46-57
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T (2005) Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 319:243-253
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T (2006) Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng* 93:1152-1163
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294
- Buschmann MD, Maurer AM, Berger E, Perumbuli P, Hunziker EB (2000) Ruthenium hexaammine trichloride chemography for aggrecan mapping in cartilage is a sensitive indicator of matrix degradation. *J Histochem Cytochem* 48:81-88
- Campbell RJ, Steele JC, Cox TA, Loerzel AJ, Belli M, Belli DD, Kurland LT (1993) Pathologic findings in the retinal pigment epitheliopathy associated with the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. *Ophthalmology* 100:37-42
- Carstanjen B, Desbois C, Hekmati M, Behr L (2006) Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. *Can J Vet Res* 70:143-147
- Cervella P, Silengo L, Pastore C, Altruda F (1993) Human beta 1-integrin gene expression is regulated by two promoter regions. *J Biol Chem* 268:5148-5155
- Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL (2007) Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res* 22:1943-1956
- Chen-Woan M, Delaney CP, Fournier V, Wakizaka Y, Murase N, Fung J, Starzl TE, Demetris AJ (1996) In vitro characterization of rat bone marrow-derived dendritic cells and their precursors. *J Leukoc Biol* 59:196-207
- Clyne MJ (1987) Pathogenesis of degenerative joint disease. *Equine Vet J* 19:15-18
- Cogger N, Perkins N, Hodgson DR, Reid SW, Evans DL (2006) Risk factors for musculoskeletal injuries in 2-year-old Thoroughbred racehorses. *Prev Vet Med* .:
- Colleoni S, Donofrio G, Lagutina I, Duchi R, Galli C, Lazzari G (2005) Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 7:154-166
- Cui Y, Wang H, Yu M, Xu T, Li X, Li L (2006) Differentiation plasticity of human fetal articular chondrocytes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 135:61-67

- Delorme B, Charbord P (2007) Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med* 140:67-81.:67-81
- Devine SM (2002) Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? *J Cell Biochem Suppl* 38:73-9.:73-79
- Diakakis N, Patsikas MN, Dessiris AK (2005) Osseous lesion of the calcaneus following the use of shock wave therapy in a horse. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52:481-483
- Dowling BA, Dart AJ, Hodgson DR, Smith RK (2000) Superficial digital flexor tendonitis in the horse. *Equine Vet J* 32:369-378
- Duan X, Yang L, Zhou Y, Xin Y, Li Q (2006) [Application of enhanced green fluorescent protein labeling technology to monitoring marrow mesenchymal stem cells migration after bone fracture]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 20:102-106
- Dyson SJ (2004) Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J* 36:415-419
- Eglitis MA, Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4080-4085
- Fackelman GE (1973) The nature of tendon damage and its repair. *Equine Vet J* 5:141-149
- Farrell E, O'brien FJ, Doyle P, Fischer J, Yannas I, Harley BA, O'connell B, Prendergast PJ, Campbell VA (2006) A Collagen-glycosaminoglycan Scaffold Supports Adult Rat Mesenchymal Stem Cell Differentiation Along Osteogenic and Chondrogenic Routes. *Tissue Eng* 12:459-468
- Fassbender HG (1983) Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Coll Relat Res* 3:141-155
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530
- Forster I, Vieira P, Rajewsky K (1989) Flow cytometric analysis of cell proliferation dynamics in the B cell compartment of the mouse. *Int Immunol* 1:321-331
- Fortier LA, Nixon AJ, Williams J, Cable CS (1998) Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 59:1182-1187
- Fortier LA, Smith RK (2008) Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24:191-201
- Freeman MA (1975) The fatigue of cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis. *Acta Orthop Scand* 46:323-328
- Freund D, Oswald J, Feldmann S, Ehninger G, Corbeil D, Bornhauser M (2006) Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34+ and CD133+ blood stem cells derived from a single donor. *Cell Prolif* 39:325-332
- Friedlander DR, Zagzag D, Shiff B, Cohen H, Allen JC, Kelly PJ, Grumet M (1996) Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves alphaV and beta1 integrins. *Cancer Res* 56:1939-1947

- Gao CY, Stepp MA, Fariss R, Zelenka P (2004) Cdk5 regulates activation and localization of Src during corneal epithelial wound closure. *J Cell Sci* 117:4089-4098
- Garrett JC (1986) Treatment of osteochondral defects of the distal femur with fresh osteochondral allografts: a preliminary report. *Arthroscopy* 2:222-226
- Goessl A (2006) Optimized thrombin dilution protocol for a slowly setting fibrin sealant in surgery. *European Surgery* 43-51
- Gomes R, Kirn-Safran C, Farach-Carson MC, Carson DD (2002) Perlecan: an important component of the cartilage pericellular matrix. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2:511-516
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13:81-88
- Hegewald AA, Ringe J, Bartel J, Kruger I, Notter M, Barnewitz D, Kaps C, Sittering M (2004a) Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue Cell* 36:431-438
- Hegewald AA, Ringe J, Bartel J, Kruger I, Notter M, Barnewitz D, Kaps C, Sittering M (2004b) Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue Cell* 36:431-438
- Henemyre-Harris CL, Adkins AL, Chuang AH, Graham JS (2008) Addition of epidermal growth factor improves the rate of sulfur mustard wound healing in an in vitro model. *Eplasty* 8:e16..e16
- Hewicker-Trautwein M, Carter SD, Bennett D, Kelly DF (1999) Immunocytochemical demonstration of lymphocyte subsets and MHC class II antigen expression in synovial membranes from dogs with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Vet Immunol Immunopathol* 67:341-357
- Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK (1996) Beta 1 integrin expression: a marker of lymphatic metastases in cutaneous malignant melanoma. *Anticancer Res* 16:2321-2324
- Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA, Hopkins N, Yaffe MB (2005) TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 309:1074-1078
- Howard RD, McIlwraith CW, Trotter GW, Powers BE, McFadden PR, Harwood FL, Amiel D (1994) Long-term fate and effects of exercise on sternal cartilage autografts used for repair of large osteochondral defects in horses. *Am J Vet Res* 55:1158-1167
- Huan Y, van Adelsberg J (1999) Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest* 104:1459-1468
- in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE (2003) Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 88:845-852
- Ivaska J, Whelan RD, Watson R, Parker PJ (2002) PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO J* 21:3608-3619

- Jaffe HL (1972) Metabolic, Degenerative and Inflammatory Diseases of Bones and Joints. The journal of bone and joint surgery
- Johnson LL (1986) Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy* 2:54-69
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272
- Kall S, Noth U, Reimers K, Choi CY, Muehlberger T, Allmeling C, Jahn S, Heymer A, Vogt PM (2004) [In vitro fabrication of tendon substitutes using human mesenchymal stem cells and a collagen type I gel]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 36:205-211
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24:1294-1301
- Kersh KD, McClure SR, Van Sickle D, Evans RB (2006) The evaluation of extracorporeal shock wave therapy on collagenase induced superficial digital flexor tendonitis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19:99-105
- Klinz FJ, Schmidt A, Schinkothe T, Arnhold S, Desai B, Popken F, Brixius K, Schwinger R, Mehlhorn U, Staib P, Addicks K, Bloch W (2005) Phospho-eNOS Ser-114 in human mesenchymal stem cells: constitutive phosphorylation, nuclear localization and upregulation during mitosis. *Eur J Cell Biol* 84:809-818
- Koerner J, Nesic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP (2006) Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:1613-1619
- Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R (2000) Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 49:328-337
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10711-10716
- Korkmaz Y, Bloch W, Steinritz D, Baumann MA, Addicks K, Schneider K, Raab WH (2006) Bradykinin mediates phosphorylation of eNOS in odontoblasts. *J Dent Res* 85:536-541
- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG (1999) Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:165-181
- Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, Takacs V, Oates TW (2000) Development of an in vitro wound healing model for periodontal cells. *J Periodontol* 71:226-237
- Lang H, Ebihara Y, Schmiedt RA, Minamiguchi H, Zhou D, Smythe N, Liu L, Ogawa M, Schulte BA (2006) Contribution of bone marrow hematopoietic stem cells to adult mouse inner ear: mesenchymal cells and fibrocytes. *J Comp Neurol* 496:187-201
- Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH, Jiang CC (2003) Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells* 21:190-199

- Lennon DP, Bruder SP, Haynesworth SE, Jaiswal N, Caplan AI (1996) Human and Animal Mesenchymal Progenitor Cells From Bone Marrow: Selection of Serum for Optimal Proliferation. *In vitro Cellular & Development Biology - Animal* 602-611
- Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI (2001) Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol* 187:345-355
- Littlewood HF (1979) Treatment of sprained tendons in horses with carbon fibre implants. *Vet Rec* 105:223-224
- Litzke LE, Wagner E, Baumgaertner W, Hetzel U, Josimovic-Alasevic O, Libera J (2004) Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann Biomed Eng* 32:57-69
- Litzke L-F (2006) Statistische Auswertung der Pferdepatienten der Chirurgischen Tierklinik Berlin in den Jahren von 1977-1988 unter besonderer Berücksichtigung der Lahmheiten. *Mh Vet -Med* 47 (1992)25-33
- Lubiatowski P, Gradys A, Manikowski W, Kruczynski J, Trzeciak T, Jaroszewski J (2005) [Value of collagen scaffolds in surgical reconstruction of articular cartilage]. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* 70:367-371
- Marquette ML, Byerly D, Sognier M (2007) A novel in vitro three-dimensional skeletal muscle model. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 43:255-263
- Marr CM, Love S, Boyd JS, McKellar Q (1993) Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses. *Vet Rec* 132:476-479
- Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ (2002) Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 30:879-886
- Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL (2005) Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* 26:6167-6175
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Boccaletti R, Testa L, Livigni S, Fagioli F (2006) Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 28:523-526
- McCullagh KG, Goodship AE, Silver IA (1979) Tendon injuries and their treatment in the horse. *Vet Rec* 105:54-57
- McGuire MK, Scheyer ET (2006) Comparison of recombinant human platelet-derived growth factor-BB plus beta tricalcium phosphate and a collagen membrane to subepithelial connective tissue grafting for the treatment of recession defects: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent* 26:127-133
- McIlwraith CW (1982) Current concepts in equine degenerative joint disease. *J Am Vet Med Assoc* 180:239-250
- McIlwraith CW, Vachon A (1988) Review of pathogenesis and treatment of degenerative joint disease. *Equine Vet J Suppl* 3-11



- Meyers VE, Zayzafoon M, Douglas JT, McDonald JM (2005) RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. *J Bone Miner Res* 20:1858-1866
- Milosevic J, Storch A, Schwarz J (2005) Cryopreservation does not affect proliferation and multipotency of murine neural precursor cells. *Stem Cells* 23:681-688
- Mitchell N, Shepard N (1976) The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 58:230-233
- Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y (2000) Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction. *J Cell Physiol* 184:207-213
- Mohr W (1987) Pathologie des Bandapparates.
- Mok SS, Masuda K, Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ (1994) Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *J Biol Chem* 269:33021-33027
- Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 17:279-290
- Morelli V, James E (2004) Achilles tendonopathy and tendon rupture: conservative versus surgical management. *Prim Care* 31:1039-54, x
- Moscoso I, Centeno A, Lopez E, Rodriguez-Barbosa JI, Santamarina I, Filgueira P, Sanchez MJ, Dominguez-Perles R, Penuelas-Rivas G, Domenech N (2005) Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc* 37:481-482
- Moskowitz RW, Goldberg VM (1987) Studies of osteophyte pathogenesis in experimentally induced osteoarthritis. *J Rheumatol* 14:311-320
- Nakamura Y, Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sakai D, Mochida J, Hotta T, Ando K (2006) Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br J Dermatol* 154:1062-1070
- Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002) Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20:1060-1069
- Nyack B, Morgan JP, Pool R, Meagher D (1981) Osteochondrosis of the shoulder joint of the horse. *Cornell Vet* 71:149-163
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10344-10349
- Owen M, Friedenstein AJ (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136:42-60.:42-60
- Peloso JG, Mundy GD, Cohen ND (1994) Prevalence of, and factors associated with, musculoskeletal racing injuries of thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc* 204:620-626



- Philipsson J (1998) Genetic aspects of diseases and lesions in horses. *Journal of Veterinary Medicine* 52:408-415
- Pick M (1987) Diagnose und Therapie der häufigsten orthopädischen Erkrankungen des Sportpferdes. *Der praktische Tierarzt* 12:26-27
- Piersanti S, Sacchetti B, Funari A, Cesare SD, Bonci D, Cherubini G, Peschle C, Riminucci M, Bianco P, Saggio I (2006) Lentiviral Transduction of Human Postnatal Skeletal (Stromal, Mesenchymal) Stem Cells: In Vivo Transplantation and Gene Silencing. *Calcif Tissue Int* .:
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147
- Pool RR, Meagher DM (1990a) Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries. *Vet Clin North Am Equine Pract* 6:1-30
- Pool RR, Meagher DM (1990b) Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries. *Vet Clin North Am Equine Pract* 6:1-30
- Poole K, Muller D (2005) Flexible, actin-based ridges colocalise with the beta1 integrin on the surface of melanoma cells. *Br J Cancer* 92:1499-1505
- RAKER CW (1962) Surgical treatment of equine osteoarthritis and tenosynovitis. *J Am Vet Med Assoc* 141:1273-5.:1273-1275
- Rapp HJ, Becker M, Heisse K, Stechele M (1992) [Diagnosis and therapy of tendinitis exemplified by the athletic horse]. *Sportverletz Sportschaden* 6:77-88
- Reiners SR, Jann HW, Stein LE, Good JK, Claypool PL (2002) An evaluation of two autologous tendon grafting techniques in ponies. *Vet Surg* 31:155-166
- Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Haupl T, Sittlinger M (2002) Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 307:321-327
- Risbud MV, Shapiro IM, Guttapalli A, Di Martino A, Danielson KG, Beiner JM, Hillibrand A, Albert TJ, Anderson DG, Vaccaro AR (2006) Osteogenic potential of adult human stem cells of the lumbar vertebral body and the iliac crest. *Spine* 31:83-89
- Romanenko A, Morell-Quadreny L, Ramos D, Nepomnyaschiy V, Vozianov A, Llombart-Bosch A (2006) Extracellular matrix alterations in conventional renal cell carcinomas by tissue microarray profiling influenced by the persistent, long-term, low-dose ionizing radiation exposure in humans. *Virchows Arch* 448:584-590
- Rompe JD (2006) Shock wave therapy for chronic Achilles tendon pain: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Orthop Relat Res* 445:276-7; author reply 277.:276-277
- Rossdale PD, Hopes R, Digby NJ, offord K (1985) Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec* %19;116:66-69
- Sammons J, Ahmed N, El Sheemy M, Hassan HT (2004) The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3). *Stem Cells Dev* 13:273-280

- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164:247-256
- Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG (1987) Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 8:413-420
- Saxena R, Pan G, McDonald JM (2007) Osteoblast and osteoclast differentiation in modeled microgravity. *Ann N Y Acad Sci* 1116:494-8. Epub; 2007 Jul 26.:494-498
- Schmidt DR, Henry JH (1989) Stress injuries of the adolescent extensor mechanism. *Clin Sports Med* 8:343-355
- Schnewlin M, Lischer C (2001) [Extracorporeal shock wave therapy in veterinary medicine.]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 143:227-232
- Schutze N, Noth U, Schneidereit J, Hendrich C, Jakob F (2005) Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun Signal* 3:5
- Schwarting R, Gerdes J, Niehus J, Jaeschke L, Stein H (1986) Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Methods* 90:65-70
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92:362-367
- Short CR, Beadle RE (1978) Pharmacology of antiarthritic drugs. *Vet Clin North Am* 8:401-417
- Silbersiepe E. Die Entzündung der Beugesehnen, Tendinitis. Berger, E. and Müller, H. 317-325. 1997.  
Ref Type: Generic
- Silver IA, Brown PN, Goodship AE, Lanyon LE, McCullagh KG, Perry GC, Williams IF (1983) A clinical and experimental study of tendon injury, healing and treatment in the horse. *Equine Vet J Suppl* 1-43
- Sittinger M, Hutmacher DW, Risbud MV (2004) Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Curr Opin Biotechnol* 15:411-418
- Slettedal JK, Lyberg T, Roger M, Beraki K, Ramstad H, Nicolaissen B (2008b) Regeneration With Proliferation of the Endothelium of Cultured Human Donor Corneas With Extended Postmortem Time. *Cornea* 27:212-219
- Slettedal JK, Lyberg T, Roger M, Beraki K, Ramstad H, Nicolaissen B (2008a) Regeneration With Proliferation of the Endothelium of Cultured Human Donor Corneas With Extended Postmortem Time. *Cornea* 27:212-219
- Smith RK (2008) Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil* 1-7
- Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE (2003a) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J* 35:99-102

- Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE (2003b) Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J* 35:99-102
- Sonnichsen HV (1975) [Tendinitis of the horse. Definition, therapy and prognosis]. *Tierarztl Prax* 3:315-322
- Stashak TS (1989) Management of lacerations and avulsion injuries of the foot and pastern region and hoof wall cracks. *Vet Clin North Am Equine Pract* 5:195-220
- Stromberg B, Rejno S (1978) Osteochondrosis in the horse. I. A clinical and radiologic investigation of osteochondritis dissecans of the knee and hock joint. *Acta Radiol Suppl* 358:139-52.:139-152
- Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR (2004) Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* 32:1212-1225
- Tan KK, Tan GH, Shamsul BS, Chua KH, Ng MH, Ruszymah BH, Aminuddin BS, Loqman MY (2005) Bone graft substitute using hydroxyapatite scaffold seeded with tissue engineered autologous osteoprogenitor cells in spinal fusion: early result in a sheep model. *Med J Malaysia* 60 Suppl C:53-8.:53-58
- Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Muller B, Zulewski H (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341:1135-1140
- Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C, Bron D (2004a) Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy* 6:372-379
- Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D (2004b) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72:319-326
- Vachon A, Bramlage LR, Gabel AA, Weisbrode S (1986) Evaluation of the repair process of cartilage defects of the equine third carpal bone with and without subchondral bone perforation. *Am J Vet Res* 47:2637-2645
- Vescovi AL, Galli R, Gritti A (2002) Clonal analyses and cryopreservation of neural stem cell cultures. *Methods Mol Biol* 198:115-23.:115-123
- Walker JM, Valli VE, Lumsden JH (1974) Colony formation in culture by bovine granulopoietic progenitor cells. *Can J Comp Med* 38:145-152
- Wallin L (2000) Estimates of longevity and causes of culling and death in Swedish warmblood and coldblood horses. *Livestock Production Science* 63:275-289
- Walter I, Handler J, Reifinger M, Aurich C (2001) Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction* 121:581-586
- Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Sun YC, Yang YJ (2005) The effect of shock wave treatment at the tendon-bone interface-an histomorphological and biomechanical study in rabbits. *J Orthop Res* 23:274-280

- Wang Z, Newman WH (2003) Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J Surg Res* 111:261-266
- Webbon PM (1977) A post mortem study of equine digital flexor tendons. *Equine Vet J* 9:61-67
- Webbon PM (1979) The racing performance of horses with tendon lesions treated by percutaneous tendon splitting. *Equine Vet J* 11:264-265
- Webbon PM, Williams RB (2002) Treatment of racehorses with corticosteroids. *Vet Rec* 151:307
- Wilmink J, Wilson AM, Goodship AE (1992) Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses. *Res Vet Sci* 53:354-359
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370
- Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J, Nixon AJ (2001) Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res* 19:738-749
- Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, Williams J (2000) Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 61:1003-1010
- Xia Z, Ye H, Locklin RM, Ferguson DJ, Cui Z, Triffitt JT (2005) Efficient characterisation of human cell-bioceramic interactions in vitro and in vivo by using enhanced GFP-labelled mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26:5790-5800
- Xu H, Hu F, Sado Y, Ninomiya Y, Borza DB, Ungvari Z, Lagamma EF, Csiszar A, Nedergaard M, Ballabh P (2008) Maturation changes in laminin, fibronectin, collagen IV, and perlecan in germinal matrix, cortex, and white matter and effect of betamethasone. *J Neurosci Res* .:
- Xu L, Liang X, Huang J, Dong Q, Xia L, Hu J, Zhang QH, Li XY (2006) [Osteogenic growth peptide regulates proliferation and differentiation of calvarial osteoblast-like cells of rat]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 37:445-448
- Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz EA, Gerritsen ME (1999) Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol* 155:887-895
- Yeh CH, Peng HC, Huang TF (1998) Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonist and inducing apoptosis. *Blood* 92:3268-3276
- Yovich JV, Trotter GW, McIlwraith CW, Norrdin RW (1987) Effects of polysulfated glycosaminoglycan on chemical and physical defects in equine articular cartilage. *Am J Vet Res* 48:1407-1414
- Zhang GQ, Fang CH, Chi DZ (2005) [Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat mesenchymal stem cells into a hepatocyte lineage in vitro]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 43:716-720

## **Unterstützung im Experiment**

Herrn Prof. Dr. Addicks möchte ich für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes und der Bereitstellung der Materialien herzlich danken. Darüber hinaus verdanke ich ihm einige anregende Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Arnhold, für die Überlassung dieses hoch interessanten Themas. Ich verdanke ihm jede erdenkliche hilfreiche Unterstützung, sowie viele anregende Diskussionen. Seiner intensiven und professionellen Betreuung, sowie die Freiheiten die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte, trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die unermüdliche und professionelle Einführung in die immunhistologischen Arbeiten, sowie die stetige Begleitung in den Experimenten während der gesamten Dauer des Forschungsprojektes, danke ich Frau Jolanta Kozlowski ganz herzlich. Sie trug mit ihren konstruktiven Ideen, die zu hervorragenden Ergebnissen führten, maßgeblich zum Gelingen bei.

Frau Janssen möchte ich für Ihre kompetente Einarbeitung in den elektronenmikroskopischen Einbettungsverfahren danken. Dank Ihrer professionellen Arbeitsweise, konnten hervorragende Ergebnisse in der Elektronenmikroskopie erzielt werden.

Herrn Hoffmann möchte ich für seine unermüdliche Geduld in sämtlichen computergestützten Auswertungen danken. Mein Dank gilt ebenso für die zahlreichen konstruktiven Gespräche, die wir während der Forschungsarbeit führten.

Bei Herrn Basnaoglu möchte ich mich für die Unterstützung in den Zellkulturexperimenten bedanken.

Frau Dr. Absenger möchte ich für die fachkundige Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden danken. Sie war jederzeit geduldig und bereit wissenschaftliche Diskussionen zu führen und Ratschläge zu geben.

Herrn Dr. Klinz danke ich für seine kritischen Fragestellungen und seine Ratschläge.

Mein Dank geht ebenso an Herrn Dr. Nohroudi, der mir mehrfach hilfreich Fragen beantwortete.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdotorandin Frau Baumgartner. Sie arbeitete mich in die Zellkulturarbeiten sehr gewissenhaft ein. Ebenso ergänzten wir uns gut in gemeinsamen Projekten. Herzlichen Dank für ihre Fröhlichkeit und Ihre Freundschaft.

Ebenso danke ich meinem Doktorandenvorgänger Herrn Klein und dem Diplomanten Herrn Kruttwig, die mich freundschaftlich in Ihr Team aufnahmen und bei sämtlichen Fragestellung unterstützend zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdotoranden, sowie alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Anatomischen Institutes, einschließlich der Mitarbeiter des Photolabors, für die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Mein Dank geht ebenfalls an die Mitarbeiter des Fachbereiches Klinik für Pferde, Abteilung Chirurgie, der Justus-Liebig-Universität in Giessen. Das Probenmaterial, welches von Ihnen zur Verfügung gestellt wurde, trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Dem gesamten Team der Tierarztpraxis Rhode möchte ich für die professionelle und trotzdem unkomplizierte Kooperation danken. Ohne Ihre Unterstützung, wäre eine klinische Auswertung kaum möglich gewesen.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben. Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Peter und Gisela Goletz, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danken möchte ich auch Detlef und Ulrike Schamberger, die mich auch in jeder Hinsicht sowohl während des Studiums, als auch während der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützten.

Ein weiteres Dankeschön gilt Monika Jenniges und Monika Gauder für Ihre Unterstützung.

Ebenso danke ich Sonya Stephenson bei der Überwindung sprachlicher Barrieren.

Ein ganz großer Dank geht an Andreas Schamberger, der mir mit unermüdlicher Ruhe und Geduld, stets zur Seite stand und mich immer wieder motivierte.

Herzlichen Dank für jedwede Unterstützung.

Desweiteren möchte ich Axel Siller danken, der mir bei der Fertigstellung der Arbeit die richtigen Anstöße gab.



## **Eigene Veröffentlichungen**

**I. Goletz, H. Klein, G. Stumpf, L.-F. Litzke, K. Addicks, S. Arnhold**

Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus dem Sternalpunktat von Pferden,  
Kongress der Anatomischen Gesellschaft September 2005 in Würzburg (Poster)

**S. Arnhold, I. Goletz, G. Stumpf, L.A. Beluche, C. Rhode, K. Addicks, L.-F. Litzke**

Isolation and characterization of equine mesenchymale stem cells for clinical  
applications in the musculoskeletal system, Tierärztekongress in Aachen August 2006  
(Poster)

**S. Arnhold, I. Goletz, H. Klein, G. Stumpf, L. Beluche, C. Rohde, K. Addicks, L.  
Litzke**

Isolation and characterization of bone marrow derived equine mesenchymal stem  
cells, AJVR Oktober 2007

## **Erklärung:**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Köln, den 25.08.2008